

OLEYL-PHOSPHOCHOLIN, EIN NEUER WIRKSTOFF ZUR BEHANDLUNG DER KANINEN VISZERALEN LEISHMANIOSE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

SONJA KLARHOF

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere,
Innere Medizin der Kleintiere und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: HDoz. Dr. A. Moritz

Oleyl-Phosphocholin, ein neuer Wirkstoff zur Behandlung der kaninen viszeralen Leishmaniose

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
Sonja Klarhof
Tierärztin aus Remscheid-Lennep

Remscheid-Lennep 2005

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Gutachter: HDoz. Dr. A. Moritz
2. Gutachter: Prof. Dr. K. Ziegler

Tag der Disputation: 11.01.2005

Meiner Familie

1. EINLEITUNG	5
1.1 Aufgabenstellung	5
2. LITERATURÜBERSICHT	7
2.1 Der Erreger der kaninen Leishmaniose	7
2.1.1 Epidemiologie	7
2.1.2 Geographische Verbreitung	8
2.1.3 Biologie des Erregers	10
2.2 Infektionswege	14
2.2.1 Infektionszyklus	14
2.2.2 Andere Infektionswege	16
2.2.3 Immunantwort nach Infektion	17
2.3 Klinische und labordiagnostische Veränderungen	21
2.3.1 Klinische Symptomatik	22
2.3.2 Labordiagnostische Veränderungen	27
2.3.3 Differentialdiagnosen	29
2.4 Erregernachweis	29
2.4.1 Indirekter Erregernachweis	31
2.4.1.1 Serologie	31
2.4.2 Direkter Erregernachweis	33
2.4.2.1 Mikroskopischer Nachweis	33
2.4.2.2 Kulturelle Anzüchtung	35
2.4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.5 Therapie und Prophylaxe	38
2.5.1 First line drugs	38
2.5.1.1 5-wertige Antimonpräparate	38
2.5.1.1.1 N-Methylglucamin-Antimoniat (Glucantime®, Rhône Mérieux)	38
2.5.1.1.2 Natrium-Stiboglukonat (Pentostam®, Wellcome)	41
2.5.2 Second line drugs	42
2.5.2.1 Allopurinol (z.B. Zyloric®, Wellcome)	42
2.5.2.2 Amphotericin B	44
2.5.2.3 Azole	45
2.5.2.4 Pentamidinisethtonat	46
2.5.2.5 Aminosidin	47
2.5.3 Prophylaktische Maßnahmen	48
2.5.3.1 Allgemeine Prophylaxemaßnahmen	49
2.5.3.2 Insektizide	50
2.5.3.3 Impfungen	51
2.6 Zukünftige Therapieansätze	54
2.6.1 Hexadecylphosphocholin (Miltefosin®, Zentaris AG)	55
2.6.1.1 Struktur und Wirkungsweise	55

2.6.1.2	Einsatz von Miltefosin® in der Humanmedizin	57
2.6.1.3	Einsatz von Miltefosin® beim Hund	60
2.6.2	Oleyl-Phosphocholin	60
2.6.2.1	Struktur.....	60
2.6.2.2	Einsatz von Oleyl-Phosphocholin in der Veterinärmedizin.....	60
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	61
3.1	Patienten.....	65
3.2	Therapieschemata.....	65
3.2.1	Vorversuch.....	66
3.2.2	Hauptversuch	66
3.2.2.1	Gruppe A	66
3.2.2.2	Gruppe B	67
3.2.2.3	Therapiewiederholer.....	67
3.3	Untersuchungsplan.....	67
3.3.1	Voruntersuchung.....	67
3.3.2	Untersuchungen während des Behandlungsintervalls	68
3.3.3	Nachuntersuchung	68
3.4	Klinische Untersuchung	69
3.5	Remissionszeit	69
3.6	Nebenwirkungen	69
3.7	Labordiagnostische Untersuchungen	71
3.7.1	Blutuntersuchung	71
3.7.2	Urinuntersuchung	72
3.8	Weiterführende Untersuchungen	73
3.8.1	Mikroskopischer Erregernachweis mittels Knochenmarkzytologie	73
3.8.2	Direkter Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	74
3.8.2.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	74
3.8.2.2	Primerauswahl.....	74
3.8.2.3	Kontrollen der PCR.....	76
3.8.2.4	DNA-Isolierung.....	76
3.8.2.5	Durchführung der PCR.....	77
3.8.2.5.1	PCR des „house-keeping“ Gens GAPDH	77
3.8.2.5.2	PCR der DNA von Leishmania infantum	78
3.8.2.6	Auswertung der PCR.....	79
3.9	Statistische Auswertung	80
4.	ERGEBNISSE.....	82
4.1	Patienten.....	82
4.1.1	Alter der Patienten	82
4.1.2	Geschlechtsverteilung.....	83
4.1.3	Rassen- und Gewichtsverteilung	84
4.1.4	Auslandsanamnestik	85

4.1.5 Vorbehandlung	85
4.1.6 Vorliegen weiterer Reisekrankheiten.....	86
4.2 Klinische Wirksamkeit.....	86
4.2.1 Klinische Symptomatik vor Therapie.....	86
4.2.2 Klinische Symptomatik nach Therapie.....	91
4.2.3 Remissionszeit	101
4.3 Nebenwirkungen	101
4.4 Labordiagnostische Veränderungen.....	105
4.4.1 Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie.....	105
4.4.2 Labordiagnostische Veränderungen nach Therapie.....	106
4.4.2.1 Vorversuch	107
4.4.2.2 Patientengruppe A und B	111
4.5 Mikroskopischer Erregernachweis und PCR	120
4.5.1 Mikroskopischer Erregernachweis vor Therapie.....	120
4.5.2 Mikroskopischer Erregernachweis nach Therapie.....	121
4.5.3 PCR vor Therapie	123
4.5.4 PCR nach Therapie	123
5. DISKUSSION.....	126
5.1 Patienten.....	127
5.1.1 Alter der Patienten	127
5.1.2 Geschlechtsverteilung.....	127
5.1.3 Rassen- und Gewichtsverteilung	127
5.1.4 Auslandsanamnestik	128
5.1.5 Vorbehandlung	128
5.1.6 Vorliegen weiterer Reisekrankheiten.....	129
5.2 Klinische Wirksamkeit.....	129
5.3 Nebenwirkungen	133
5.4 Labordiagnostische Veränderungen.....	136
5.5 Mikroskopischer Erregernachweis und PCR	145
5.6 Die Behandlung der kaninen Leishmaniose mit Oleyl-Phosphocholin im Vergleich mit N-Methylglucamin-Antimoniat (Glucantime [®] , Rhône Mérieux)	148
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	155
7. SUMMARY	157
8. LITERATURVERZEICHNIS	159
9. ANHANG.....	194
9.1 Lösungen und Puffer	194
10. DANKSAGUNG	204

Im Text verwendete Abkürzungen

Ag	=	Antigen
Ak	=	Antikörper
ALT	=	Alanin-Amino-Transferase
AP	=	alkalische Phosphatase
AS	=	Antisense
ATP	=	Adenosintriphosphat
BCG	=	Bacillus Calmette-Guerin
bp	=	Basenpaare
bzw.	=	beziehungsweise
C	=	Celsius
ca.	=	zirka
CD	=	"cluster of differentiation"
CD4	=	CD4-Antigen
CD8	=	CD8-Antigen
CD25	=	CD25-Antigen
CoA	=	Coenzym A
dl	=	Deziliter
DNA	=	"desoxyribonucleid acid", Desoxyribonukleinsäure
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
ELISA	=	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
et al.	=	et alii
g	=	Gramm, Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/sec}^2$)
GAPDH	=	Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ggr.	=	geringgradig
GLDH	=	Glutamat-Dehydrogenase
gp63	=	63-kDa-Glykoprotein
HCl	=	Salzsäure
HDL	=	"high density lipoproteins", Lipoproteine mit hoher Dichte
hgr.	=	hochgradig
HIV	=	"human immunodeficiency virus", humanes Immundefizienz-Virus

IFAT	=	indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IFN	=	Interferon
IgG	=	Immunglobulin G
IgM	=	Immunglobulin M
IL	=	Interleukin
i.m.	=	intramuskulär
iNOS	=	induzierbare Nitritoxidsynthetase
i.v.	=	intravenös
JLU	=	Justus-Liebig-Universität
KCL	=	Kaliumchlorid
kDa	=	kilo-Dalton
kg	=	Kilogramm
KGW	=	Körpergewicht
l	=	Liter
L.	=	Leishmania
LACK	=	"Leishmanial Receptor for Activated C Kinase"
LAT	=	Latex-Agglutinationstest
LDL	=	"low density lipoproteins", Lipoproteine mit einer niedrigen Dichte
LEF	=	"Leishmania enhancing factor"
m	=	männlich, Meter
mA	=	Milliampere
mg	=	Milligramm
mgr.	=	mittelgradig
MHC	=	"major histocompatibility complex", Haupthistokompatibilitätskomplex
mk	=	männlich-kastriert
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimol
MPC	=	"mean platelet component concentration"
mRNA	=	"messenger"RNA
µg	=	Mikrogramm
µl	=	Mikroliter
µmol	=	Mikromol

n.b.	=	nicht bekannt
n.d.	=	nicht durchgeführt
NaCl	=	Natriumchlorid
NADPH	=	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NK-Zellen	=	natürliche Killerzellen
nm	=	Nanometer
NNN	=	Novy-McNeal-Nicolle
NO	=	Stickstoffmonoxid
Nr.	=	Nummer
OD ₂₆₀	=	optische Dichte bei 260 nm
OD ₂₈₀	=	optische Dichte bei 280 nm
Ol-PC	=	Oleyl-Phosphocholin
PBMC	=	"peripheral blood mononuclear cell", mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PCDW	=	"platelet component distribution width"
PCR	=	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
PCV	=	"packed cell volume", Hämatokrit (Erythrozytenvolumen)
pmol	=	Pikomol
PT	=	Prothrombinzeit
PTT	=	Partielle Thromboplastinzeit
RES	=	Retikuloendotheliales System
RNA	=	"ribonucleic acid", Ribonukleinsäure
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute
RTG	=	Resonanzthrombogramm
S	=	Sense
s.c.	=	subkutan
TGF	=	"transforming growth factor", autokriner Wachstumsfaktor
Th0-Zellen	=	Typ 0 T-Helferzellen
Th1 -Zellen	=	Typ 1 T-Helferzellen
Th2-Zellen	=	Typ 2 T-Helferzellen
TNF	=	"tumor necrosis factor", Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U	=	Unit
UV	=	Ultraviolett
V	=	Volt
v.a.	=	vor allem
w	=	weiblich
WHO	=	"World Health Organisation", Weltgesundheitsorganisation
wk	=	weiblich-kastriert
z.B.	=	zum Beispiel
z.T.	=	zum Teil

1. Einleitung

Infolge des weit verbreiteten Vorkommens des Erregers und der fortschreitenden Ausweitung endemischer Gebiete handelt es sich bei der Leishmaniose um eine Erkrankung von zunehmender Bedeutung. Da neben dem Menschen vor allen Dingen auch Hunde den Erreger beherbergen können und als Erregerreservoir gelten, spielt die kanine Leishmaniose aufgrund ihres Zoonosepotentials eine wichtige Rolle. Darüber hinaus wird durch urlaubsbedingte Mitnahme der Tiere in betroffene Länder sowie durch Import von Hunden aus diesen Regionen die Erkrankung immer häufiger auch in nicht endemischen Gebieten diagnostiziert. Die Therapie der Leishmaniose gewinnt daher zunehmend an Bedeutung. Die Therapie leishmaniosekranker Hunde stellt sich für den behandelnden Tierarzt jedoch oft problematisch dar. Derzeit befindet sich kein Präparat auf dem Markt, das zu einer Heilung (im Sinne einer Erregerfreiheit im Knochenmark) führen kann. Außerdem weisen die gebräuchlichen Therapeutika häufig hohe Nebenwirkungen auf. Aus diesem Grund wird weltweit nach wirksameren und verträglicheren Medikamenten geforscht.

Bei Oleyl-Phosphocholin (Ol-PC) handelt es sich um ein dem Hexadecylphosphocholin verwandten Präparat (Miltefosin[®]), welches zur Zeit beim Menschen im Rahmen einer Phase-IV-Studie mit gutem klinischem Erfolg und tolerierbaren Nebenwirkungen zur Behandlung der Leishmaniose eingesetzt wird. Beim Hund fand das Medikament bisher nur in Einzelfällen Einsatz. Eingehende Untersuchungen wurden bislang bei dieser Tierart noch nicht durchgeführt.

1.1 Aufgabenstellung

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, den Einsatz von Oleyl-Phosphocholin - ein neuer Wirkstoff in der Therapie der kaninen Leishmaniose- an Hunden zu untersuchen, die als Patienten in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität in Giessen mit Leishmaniose vorgestellt wurden.

Im Einzelnen sollte überprüft werden, inwieweit die Behandlung mit Ol-PC zu einer Besserung sowohl der klinischen Symptomatik als auch labordiagnostischer Veränderungen, die im Rahmen der kaninen Leishmaniose auftreten können, führt.

Nach Abschluß der Therapie wurde eine Untersuchung des Knochenmarkes mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Diese diente der Überprüfung, ob der Einsatz des Präparates zu einer Erregerfreiheit im Knochenmark und in diesem Sinne zu einer Heilung führen kann.

Des Weiteren sollten auftretende Nebenwirkungen erfasst, dokumentiert und in Hinsicht auf ihre Tolerierbarkeit ausgewertet werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Der Erreger der kaninen Leishmaniose

2.1.1 Epidemiologie

Der im Jahre 1900 vom britischen Tropenarzt Sir W.B. Leishman und C. Donovan erstmals in Indien entdeckte Erreger der Leishmaniose (*Leishmania donovani*) ist ein intrazellulär, überwiegend in Makrophagen vorkommender Parasit. Die durch ihn verursachte, häufig tödlich verlaufende Infektionskrankheit wird durch weibliche Phlebotomen (Schmetterlingsmücken) übertragen und erlangt aufgrund ihres Zoonosepotentials besondere Bedeutung. Neben Menschen und Hunden können auch andere Säuge- und Wirbeltiere als potentielle Wirtsorganismen fungieren. Hierzu zählen neben weiteren Kaniden -wie Schakalen und Füchsen- Ziegen und Nager (z.B. Ratten, Eichhörnchen und Spitzmäuse) aber auch Katzen, Pferde, Stachelschweine und Reptilien. (GESSNER et al., 1994; BOGDAN, 1998; BANETH und JAFFE, 1999; ZAHNER, pers. Mitteilung). Je nach geographischer Region können die verschiedenen Tierarten ein Erregerreservoir darstellen (BOGDAN, 1998).

Der Hund gilt in vielen Ländern als Erregerreservoir der humanen, viszeralen, durch *Leishmania (L.) infantum* bedingten Leishmaniose und spielt aus diesem Grund im Rahmen der Verbreitung der Erkrankung eine wesentliche Rolle (MILES et al., 1999). Insbesondere Hunde, die den Erreger beherbergen, aber klinisch unauffällig sind, stellen eine nur schwer zu identifizierende Infektionsquelle dar. So weisen beispielsweise in einer Untersuchung von NOLI (1999) bis zu 15 % der Hunde in Südeuropa positive Leishmanien-Antikörpertiter auf, wobei bis zu 40 % dieser Tiere klinisch unauffällig sind.

Im Gegensatz zum Hund handelt es sich bei der Katze um einen eher selten betroffenen Wirtsorganismus (PENNISI, 2002). Häufig wird bei dieser Tierart daher nur von sporadischen Erkrankungsfällen berichtet (OZON et al., 1998; HERVAS et al., 1999; POLI et al., 2002). Jedoch konnte in Untersuchungen von PENNISI (1998, 1999) in Süditalien (Sizilien) eine erhöhte Prävalenz auch bei Katzen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten von 93 untersuchten Tieren 59 % einen Titer über 1 : 40 (PENNISI, 2002).

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit rund 12 Millionen Menschen an Leishmaniose erkrankt. Von zirka 350 Millionen infektionsgefährdeten Menschen treten jährlich etwa 1 - 1,5 Millionen neue Fälle von kutaner und etwa 500.000 neue Fälle von viszeraler Leishmaniose auf. Ein Anstieg der Erkrankungshäufigkeit über die letzten Jahre ist zu verzeichnen (GRADONI, 1999). Besonders infektionsgefährdet sind Menschen, die unter einer Suppression des Immunsystems leiden. Hierzu zählen vor allen Dingen HIV-infizierte Personen, so daß ein erhöhter Anteil an Leishmania/HIV-Co-Infektionen registriert werden kann (ALVAR et al., 1996; ALVAR 1999). Darüber hinaus besteht eine erhöhte Erkrankungsgefahr für Menschen, deren Immunsystem durch Langzeitbehandlungen mit Kortikosteroiden oder durch eine Chemotherapie geschwächt ist (ALVAR, 1999).

2.1.2 Geographische Verbreitung

Die Leishmaniose stellt eine parasitäre Infektionskrankheit mit weltweiter Verbreitung dar. Mit Ausnahme von Australien tritt sie auf allen Kontinenten der Erde auf. 88 Länder (darunter 72 Entwicklungsländer) zählen laut WHO zu den endemischen Gebieten. Neben Ländern in Südamerika, Asien und Afrika sind in Europa vor allem die Mittelmeeranrainerstaaten Spanien, Südfrankreich (einschließlich Korsika), Italien (einschließlich Sizilien und Sardinien), Griechenland (einschließlich Kreta), Kroatien sowie Portugal betroffen. GRADONI (1999) berichtet auch von Fällen in Bosnien-Herzegowina. Weitere Mittelmeeranrainerstaaten wie Albanien, Algerien, Ägypten, Zypern, Israel, Libanon, Libyen, Marokko, Syrien, Tunesien und die Türkei gelten ebenfalls als endemische Gebiete (DEREURE et al., 1999).

Die geographische Verbreitung der Erkrankung ist – mit Ausnahme von einigen autochthonen Fällen - eng an die geographische Verbreitung des Vektors gebunden. Hierbei handelt es sich um blutsaugende, 2-3 mm große, weibliche Schmetterlingsmücken, die in ihrer Funktion als Zwischenwirt für die Verbreitung der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen. In der Alten Welt (Afrika, Asien, Europa) fungieren Schmetterlingsmücken der Gattung *Phlebotomus* als Vektor, in der Neuen Welt (Amerika) dagegen Schmetterlingsmücken der Gattung *Lutzomyia* (NOLI, 1999). Allerdings konnte bisher nicht für alle Arten eine Vektorenkompetenz belegt werden. So sind laut WHO von 500 bekannten Phlebotomenarten lediglich 30 Arten in der Lage, den Parasiten zu übertragen.

Als nachgewiesene Vektoren gelten im Bereich des Mittelmeeres 9 Phlebotomenarten (KILLICK-KENDRICK und KILLICK-KENDRICK, 1999). Hierzu zählt beispielsweise *Phlebotomus perniciosus* als Vektor viszeraler Leishmaniose für *L. infantum* in Frankreich, Italien, Spanien, auf Malta und in Nordafrika. Darüberhinaus konnte diese Schmetterlingsmückenart bereits in weiteren Ländern, wie z.B. England (Jersey), Portugal, Rußland (Aserbaidshan) und in der Schweiz ermittelt werden. Ein weiterer nachgewiesener Vektor für *L. infantum* in Südeuropa ist *Phlebotomus perfiliewi*. Diese Schmetterlingsmückenart überträgt die viszerale Leishmaniose in Italien und Algerien, wurde aber auch in weiteren Mittelmeeraanrainerstaaten identifiziert und gilt in einigen dieser Länder (z.B. Griechenland, ehemaliges Jugoslawien, Tunesien) als verdächtiger Vektor (NAUCKE, 2003).

Obwohl Deutschland nicht zu den endemischen Gebieten der Leishmaniose zählt, gelang im Juli 1999 der Erstnachweis von Schmetterlingsmücken durch NAUCKE und PESSON auch in Baden-Württemberg. Bis zum Ende des Jahres 2001 konnten an über 10 verschiedenen Lokalisationen über 100 Exemplare von *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen werden. Ein Zwischenwirt für die Erkrankung und die Möglichkeit zur Übertragung von Erregern existiert somit zumindest theoretisch auch hier, jedoch ist über eine Vektorkompetenz für diese Art bisher nichts bekannt (NAUCKE und PESSON, 2000). *Phlebotomus mascittii* wurde außerdem in Frankreich, Griechenland, Italien, Spanien, Schweiz, auf Zypern, in Algerien, in der Türkei und im ehemaligen Jugoslawien nachgewiesen (NAUCKE, 2003).

Seit 1993 wird von der WHO eine geographische Ausbreitung endemischer Gebiete und eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit beobachtet. Durch Veränderungen des Weltklimas scheint es dem Vektor möglich zu sein, sich in bislang „zu kalten“ Klimazonen anzusiedeln. Berichte über Leishmaniose in bisher nicht endemischen Gebieten treten zunehmend auf. Beispiel ist hierfür der serologische Nachweis von *Leishmania infantum* bei 2,6 % von 612 untersuchten Hunden in 2 Kommunen der „Emilia-Romagna-Region“ an der Adria-Küste im Norden Italiens. *Phlebotomus perniciosus* und *Phlebotomus perfiliewi* konnten als potentielle Vektoren in diesem Gebiet nachgewiesen werden. Bis zum Auftreten erster Fälle von Leishmaniose im Jahr 1998 galt diese Region als frei von dieser Erkrankung (BALDELLI et al., 2001). Durch weitere Untersuchungen muß allerdings noch geklärt werden, ob das Risiko einer Übertragung hier auf Dauer besteht. Ein weiteres Beispiel für die Ausweitung endemischer Gebiete stellt Israel dar (BANETH und JAFFE, 1999). Während bis 1994 vor

allem von Fällen im Norden des Landes berichtet wurde, treten nun auch vermehrt Fälle von humaner und kaniner Leishmaniose in südlicheren Regionen des Landes auf. In diesem Fall kann ursächlich wahrscheinlich eine Zunahme der Population von Schakalen und Füchsen in Betracht gezogen werden, die sich vermehrt in der Umgebung menschlicher Siedlungen aufhalten (BANETH und JAFFE, 1999).

In einigen Gebieten der Welt (z.B. in Brasilien, Afghanistan und Syrien) lässt sich in Abhängigkeit von der wirtschaftlichen Entwicklung des Landes eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit beobachten. Im Rahmen des Wachstums großer Städte entstehen Vororte mit einer sehr hohen Populationsdichte, in denen Schmetterlingsmücken gute Voraussetzungen zur Vermehrung finden, da neben schlechten hygienischen Verhältnissen eine hohe Anzahl von Hunden anzutreffen ist (DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2002). Vor allem in Brasilien ziehen viele Menschen von ländlichen Gegenden in die Vororte der großen Städte, in denen *Lutzomyia longipalpis* gute Voraussetzung zur Vermehrung findet (TESH, 1995). In den nordöstlichen Gebieten Brasiliens verdoppelte sich die Anzahl der Erkrankungen der zoonotischen viszerale Leishmaniose in den letzten 2 Jahren (DESJEUX, 2002).

Bei Hunden wird die Erkrankung immer häufiger auch in nicht endemischen Gebieten festgestellt. Grund hierfür ist die urlaubsbedingte Mitnahme von Tieren in das südliche Ausland sowie der Import von Hunden aus den betroffenen Regionen. So ergaben Untersuchungen von GOTHE et al. (1997) in Deutschland bei 236 Hunden innerhalb eines Zeitraumes von 32 Monaten die Diagnose „Leishmaniose“. Bei 132 dieser Fällen wurden die Besitzer der Tiere bezüglich der Auslandsanamnestik befragt: Zirka (ca.) $\frac{3}{4}$ der Tiere stammte aus endemischen Gebieten und wurde nach Deutschland importiert, ca. $\frac{1}{4}$ der Tiere hatte die Besitzer im Rahmen eines Urlaubsaufenthaltes in das südliche Ausland begleitet.

In Deutschland stellt die wichtigste Erregerart der kaninen Leishmaniose aufgrund des häufigen Vorkommens in den Mittelmeeranrainerstaaten *L. infantum* dar (GOTHE, 1991).

2.1.3 Biologie des Erregers

Der Erreger der kaninen Leishmaniose ist ein einzelliger Parasit, der zu seiner vollständigen Entwicklung zwei verschiedene Wirtsorganismen benötigt. Als Hauptwirte fungieren hierbei zahlreiche Wirbeltiere, als Zwischenwirt benötigen die Parasiten ein Insekt (BOGDAN, 1998). Aufgrund dieser besonderen Eigenschaft verändern Leishmanien im Laufe ihres

Entwicklungszyklus ihre Zellstruktur: Da sie im Hauptwirt intrazellulär in Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES) vorkommen, treten sie hier in einer runden, unbegeißelten (amastigoten) Form auf (GESSNER et al., 1994). Die Größe des Erregers beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa $2,5 \times 1,5$ bis $6,8 \times 4,5 \mu\text{m}$ (GOTHE, 1991). Im Insekt liegen die Parasiten dagegen extrazellulär im Magendarmtrakt vor. Hier wächst das zuvor in einer Einstülpung der Zelloberfläche liegende Geißelrudiment zu einer langen Geißel aus (GESSNER et al., 1994). Diese begeißelte (promastigote) Form ist spindelförmig und etwa $10\text{-}20 \mu\text{m}$ groß (GOTHE, 1991).

Die Ultrastruktur sowohl der amastigoten als auch der promastigoten Form weist zahlreiche Zellorganellen wie Zellkern, Mitochondrien, rauhes und glattes Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex auf (ASHFORD and BATES, 1998). Unter der Zellmembran befindliche Mikrotubuli fungieren als eine Art Zytoskelett. Abschnitte der Zellmembran, welche die Geißeltasche der amastigoten Form bilden, sind vor allen Dingen für die Exo- und Endozytose zuständig (WEBSTER und RUSSEL, 1993; LANDFEAR und IGNATUSHCHENKO, 2001). Kennzeichnend ist für beide Formen ein stäbchenförmiger Kinetoplast, der reich an mitochondrialer DNA ist (ASHFORD und BATES, 1998; NOLI, 1999). Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften zählen die Erreger der Leishmaniose zur Klasse der Kinetoplastidae und der Familie der Trypanosomatidae (NOLI, 1999).

Während laut WHO für den Menschen über 20 Leishmanienspezies und Subspezies als pathogen gelten, umfasst die Erregerfauna der kaninen Leishmaniose vor allem folgende Erreger: In der Alten Welt kann bei der überwiegenden Mehrheit der Hunde *L. infantum* isoliert werden. Darüber hinaus treten hier *L. tropica* und *L. aethiopica* auf (DEREURE et al., 1999). In der Neuen Welt dagegen herrscht *L. chagasi*, *L. mexicana* und *L. braziliensis* vor (DEREURE et al., 1999). Die einzelnen Arten können unterschiedliche Symptome hervorrufen und sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt. Die beim Hund auftretenden Erreger können ausnahmslos auf den Menschen übertragen werden (GOTHE, 1991).

Tabelle 1: Zusammenfassung der Erreger der kaninen Leishmaniose und die von ihnen bedingten Symptome (nach NOLI, 1999)

Vorkommen	Erkrankungsform
Alte Welt (Afrika, Asien, Europa)	
L. infantum	viszeral
MON-1, MON-11, MON-27, MON-34, MON-37, MON-77, MON-98, MON-105, MON-108 *	
L. tropica	viszeral, kutan
MON-76, MON-103, MON-113 *	
Neue Welt (Amerika)	
L. chagasi	viszeral
L. mexicana	symptomlos
L. braziliensis	mukokutan

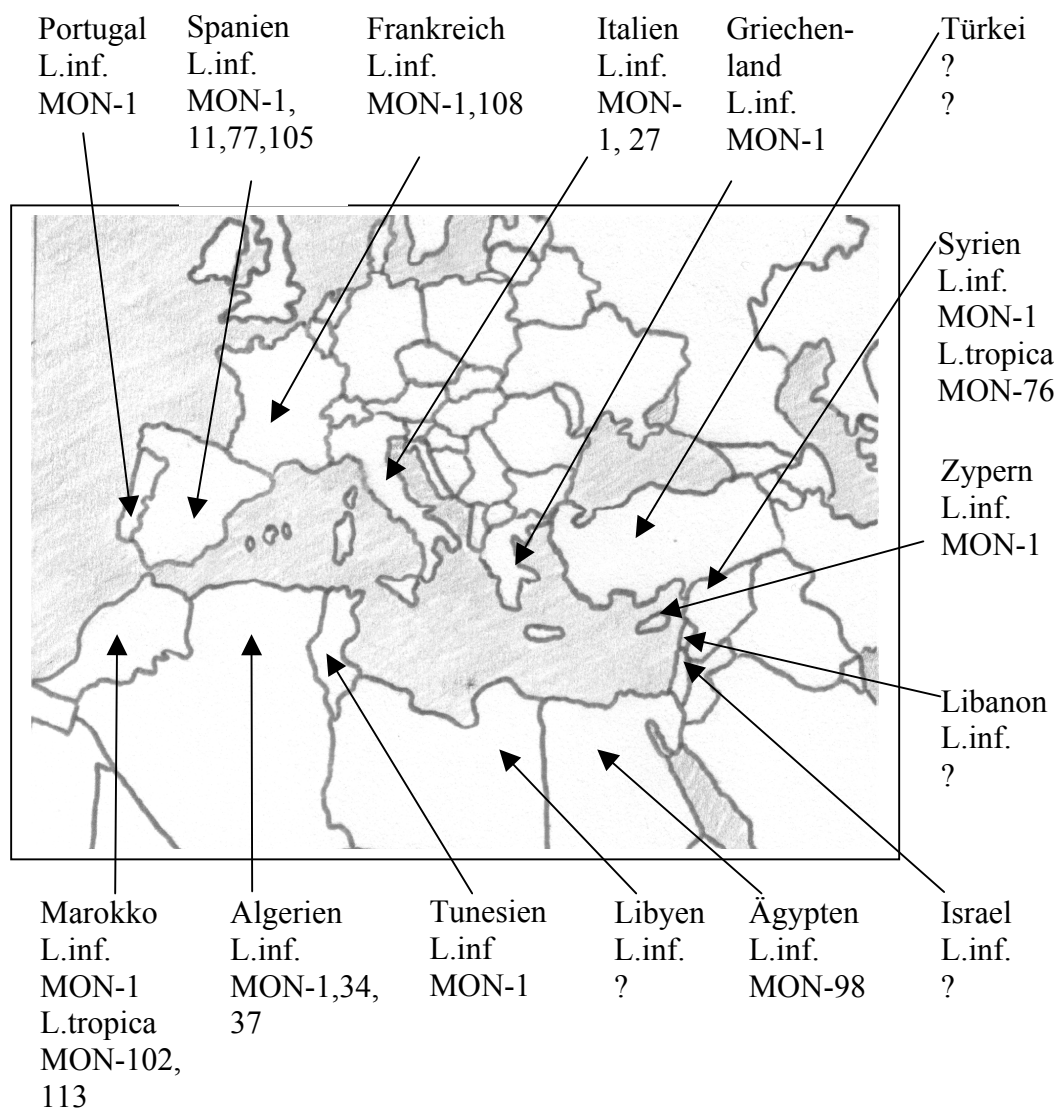
* bisher nachgewiesene Zymodeme im Mittelmeerraum

Eine weitere Unterteilung der Erreger erfolgt mittels Isoenzymen, die nach elektrophoretischer Auftrennung bestimmt werden können (NOLI, 1999). Anhand dieser Methode werden sogenannte „Zymodeme“ unterschieden. Bei den dominierenden Erregerarten der Alten Welt (*L. infantum* und *L. tropica*) konnten auf diese Weise bisher 9 bzw. 3 verschiedene Zymodeme charakterisiert werden (DEREURE et al., 1999). Das am häufigsten bei *L. infantum* isolierte Zymodem stellt MON-1 mit einer Verbreitung über den gesamten Mittelmeerraum dar. 1998 gelang der Nachweis von MON-1 auch auf Zypern (DEPLAZES et al., 1998). Die geographische Verbreitung der einzelnen Zymodeme ist in Abbildung 1 dargestellt.

Infolge ihrer Abhängigkeit vom Vektor sind die Parasiten an verschiedene Umgebungsfaktoren und klimatischen Bedingungen gebunden. Temperaturen unter 5° C und über 30° C führen beispielsweise zum Absterben der Leishmanien im Überträger

(OPITZ, 1996). Eine Übertragung findet daher in Abhängigkeit vom Klima meist zwischen den Monaten Mai und Oktober statt (GRADONI, 1999; KILLICK-KENDRICK und KILLICK-KENDRICK, 1999). Das dauerhafte Vorhandensein von starkem Wind oder das Fehlen jeglicher Vegetation verhindert die Ansiedlung von Vektoren und somit auch von Erregern. In Höhen über 900 m oder in den Zentren von Städten sind in der Regel keine Vektoren anzutreffen, Parasiten können sich daher hier ebenfalls nicht vermehren (GRADONI, 1999). Bevorzugt wird dagegen die Nähe menschlicher Siedlungen und ausreichender Vegetation, da vor allem in feuchtem, organischem Milieu optimale Bedingungen zur Vermehrung der Vektoren herrschen (GESSNER et al., 1994).

Abbildung 1: Die geographische Verbreitung der verschiedenen Zymodeme von *L. infantum* und *L. tropica* im Mittelmeerraum (nach DEREURE, 1999)



2.2 Infektionswege

2.2.1 Infektionszyklus

Weibliche Schmetterlingsmücken der Gattung *Phlebotomus* (Alte Welt) und *Lutzomyia* (Neue Welt) nehmen während einer Blutmahlzeit an einem infizierten Tier amastigote, intrazellulär in den Zellen des RES vorliegende Leishmanien auf. Mit dem Nahrungsstrom gelangen die Parasiten in den Verdauungstrakt des Insektes. Zellen des Darmes produzieren hier eine chitinhaltige Membran, die den Nahrungsbolus umschließt (ASHFORD und BATES, 1998; KILLICK-KENDRICK, 2002). Bereits zu diesem Zeitpunkt scheinen sich die amastigoten Formen in prozyklische Promastigote umzuwandeln. Erste Teilungsschritte dieser Formen erfolgen. Die Bildung von chitinolytischen Enzymen durch die Leishmanien ermöglicht im Anschluß eine „gezielte“ Freisetzung der Erreger im mittleren Darmabschnitt (ASHFORD und BATES, 1998; KILLICK-KENDRICK, 2002). Hier erfolgt die Vermehrung der Erreger durch Längsteilung sowie ihre Transformation zu infektiösen metazyklischen Promastigoten (ASHFORD und BATES, 1998).

Um zu diesem Zeitpunkt einen Weitertransport mit der Nahrung zu vermeiden und auf diese Weise die Etablierung einer Infektion zu gewährleisten, heften sich die Parasiten an das Darmepithel an (GESSNER et al., 1994). Es konnte nachgewiesen werden, daß Glykokonjugate (Lipophosphoglykane) auf der Zelloberfläche von Promastigoten eine wesentliche Rolle bei der Anheftung an die Oberfläche des Darmes spielen (TURCO, 1990; SACKS et al., 1995). Unterschiedliche Subgenera der Erreger scheinen verschiedene Strategien der Adhäsion entwickelt zu haben. Vertreter des Subgenus „*Leishmania*“ (hierzu zählen z.B. alle Erreger der Alten Welt) verankern sich im mittleren Darmabschnitt mit Hilfe ihrer Geißeln zwischen den Mikrovilli der Darmoberfläche (KILLICK-KENDRICK, 2002), während Vertreter des Subgenus „*Viannia*“ (z.B. *L. braziliensis*) sich im hinteren Darmabschnitt mit Hilfe einer besonderen Struktur der Geißel, die als Hemidesmosom bezeichnet wird, an der chitinartigen Oberfläche des Darmes fixieren (ASHFORD und BATES, 1998; KILLICK-KENDRICK, 2002).

Die infektiösen metazyklischen Formen wandern entgegen dem Nahrungsstrom in kraniale Darmabschnitte des Insektes ein und heften sich hier mittels Hemidesmosom an der Valvula cardiaca an. Die Freisetzung von Chitinase durch Leishmanien scheint diese Struktur zu

schädigen. Eine daraus resultierende Dysfunktion ermöglicht ein Regurgitieren der Erreger während der nächsten Blutmahlzeit (SCHLEIN et al., 1992).

Ob es neben diesem Mechanismus noch weitere Übertragungsmöglichkeiten gibt, steht noch zur Diskussion. Da Leishmanien in der Lage sind, in den Stechapparat der Schmetterlingsmücken vorzudringen, besteht hierin eine weitere Möglichkeit zur Übertragung auf einen Wirtsorganismus (KILLICK-KENDRICK, 2002). In einigen Untersuchungen konnten Parasiten in Speicheldrüsen von Vektoren nachgewiesen werden, so daß auch auf diesem Weg eine Übertragung denkbar wäre (KILLICK-KENDRICK, 2002).

Mittels Insektenstich werden ca. 100-1000 infektiöse, metazyklische Promastigote in die Haut des Wirtsorganismus übertragen. Obwohl ein Großteil der Erreger zu diesem Zeitpunkt durch Einwirkung von Komplement inaktiviert wird (FERRER, 2002), reicht laut RIOUX (1979) ein Stich einer einzigen infizierten Sandmücke aus, um die Krankheit zu übertragen. Intradermal kommt es zur komplementabhängigen Adhäsion der Leishmanien an ihre Zielzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhanszellen) (FERRER, 2002). Nach Phagozytose und Fusion mit Lysosomen entstehen im Anschluß die sogenannten Phagolysosomen. Hier erfolgt die erneute Umwandlung in die amastigote Form. Schutz vor lysosomalen Enzymen und somit vor intrazellulärer Degeneration der Parasiten scheint in diesem Zusammenhang die proteolytische Aktivität von gp63 zu geben (ASHFORD und BATES, 1998; SOLBACH und LASKAY, 2000).

Die Aufnahme von Parasiten in die Haut bedingt zunächst eine lokale Entzündungsreaktion. Im histologischen Schnitt lassen sich initial vermehrt neutrophile und eosinophile Granulozyten nachweisen. Ein vermehrtes Vorkommen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist ebenfalls möglich. Weitere Stadien sind durch Makrophagen und - nach Etablierung einer granulomatösen Entzündung - durch Lymphozyten gekennzeichnet (FERRER, 2002). Die NK-Zellen und die von ihnen beeinflussten Zytokinmuster spielen in der Initialphase der Infektion eine wesentliche Rolle. In großer Anzahl vertreten, vermögen sie durch vermehrte Produktion von IFN- γ die sogenannte induzierbare Nitrit-Oxid-Synthetase (iNOS) derart zu aktivieren, daß ein intrazelluläres Abtöten von Leishmanien gefördert wird und auf diese Weise eine systemische Ausbreitung des Erregers verhindert werden kann (BELKAID et al., 2000; SOLBACH und LASKAY, 2000). Kann eine Vermehrung der Parasiten auf diese Weise nicht verhindert werden, gelangen die Erreger

mittels Zellen der monozytären Reihe über die regionalen Lymphknoten in den gesamten Organismus. Neben Milz und Leber wird vor allen Dingen auch das Knochenmark bevorzugt befallen (FERRER, 2002). Bei diesen Tieren entwickeln sich in der Regel in einer Zeitspanne von 3 Monaten bis zu mehreren Jahren nach Infektion erste klinische Anzeichen der Erkrankung (FERRER, 2002).

2.2.2 Andere Infektionswege

Infektionen, die nicht auf der Übertragung von Erregern durch Schmetterlingsmücken beruhen, treten lediglich sporadisch auf. Zwar vermögen andere Insekten die Parasiten im Magendarmtrakt kurzfristig zu beherbergen, jedoch scheiden diese ihn nach Abtötung wieder aus (GESSNER et al., 1994). KILLICK-KENDRICK (1999) berichtet von der Fähigkeit der Leishmanien, sich im Verdauungsapparat von Mücken, denen keine Vektorkompetenz zugesprochen wird, zu vermehren. Allerdings werden auch hier die Erreger mit den verdauten Nahrungsbestandteilen wieder ausgeschieden (KILLICK-KENDRICK und KILLICK-KENDRICK, 1999; KILLICK-KENDRICK, 2002). Ein mechanischer Transfer von Parasiten mittels *Rhipicephalus sanguineus* konnte in vitro bereits nachgewiesen werden (McKENZIE, 1984).

Fälle von nicht-vektorieller Übertragung werden sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin beschrieben (MAZZI, 1976; DIAZ-ESPINEIRA und SLAPPENDEL, 1997; MORITZ und STEUBER, 1999; BOGDAN et al., 2001; GASKIN et al., 2002). So besteht die Möglichkeit, Leishmanien mittels infizierter Blutkonserven zu übertragen (KUBAR et al., 1997; OWENS et al., 2001). Darüber hinaus scheint eine diaplazentare Infektion möglich zu sein. Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin werden entsprechende Fälle geschildert (BLANC und ROBERT, 1984; MITTAL et al., 1987; EL-TOUM, 1992). MORITZ et al. (1999) berichteten beispielsweise von einer zwei Jahre alten Stafford Terrierhündin, die weder aus einem endemischen Gebiet stammte, noch in solche Gebiete urlaubsbedingt verbracht wurde. Da jedoch die Erkrankung bereits bei dem aus dem südlichen Ausland stammenden Muttertier zuvor diagnostiziert wurde, liegt eine diaplazentare Infektion nahe. Ebenso scheint eine Übertragung der Erreger über den Deckakt nicht ausgeschlossen zu sein. In Urin und Sperma von experimentell infizierten Hunden konnte *Leishmania infantum* nachgewiesen werden (RIERA und VALLADARES, 1996).

Da die Erreger intrazellulär in monozytären Zellen vorliegen, kann eine Übertragung durch direkten Kontakt ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Blutige Läsionen an Haut und Schleimhäuten stellen theoretisch eine Infektionsquelle dar, bei der es sowohl beim Menschen als auch beim Tier zum Übertritt infizierter Zellen in einen anderen Organismus kommen kann (NOLI, 1999). Beim Menschen sind vor allem Drogen abhängige infektionsgefährdet, da die Erreger über infizierte Nadeln übertragen werden können (AMELA et al., 1996).

2.2.3 Immunantwort nach Infektion

Nachdem mittels Insektenstich metazyklische Promastigote intradermal appliziert wurden, nehmen die Leishmanien in der Haut Kontakt zu ihren Zielzellen (v.a. Langerhanszellen und Makrophagen) auf. Die Mechanismen der Kontaktaufnahme sind vielfältig und beruhen in der Regel auf Strukturen der Zelloberfläche der Parasiten: So interagiert beispielsweise das Oberflächenmolekül gp63 mit dem im Serum des Wirtes vorliegenden Komplementfaktor C3. Außerdem besteht die Möglichkeit der Kontaktaufnahme zu den Zielzellen mittels Fibronectin auf der Zelloberfläche der Erreger und Fibronectinrezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen (GESSNER et al., 1994). Nach Bindung an der Oberfläche der Wirtszelle über Rezeptoren kommt es zur Phagozytose (GESSNER et al., 1994).

Aufgrund ihres intrazellulären Vorkommens im Wirtsorganismus vermögen Antikörper nicht, die Parasiten zu eliminieren. Die Erreger können lediglich über zelluläre Abwehrmechanismen in ihrer Vermehrung gehemmt und abgetötet werden (BOGDAN, 1998). Für die Entwicklung einer effektiven zellulären Abwehr ist die Abwehrsituation des Wirtes zum Zeitpunkt der Infektion von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmt, ob es im Folgenden gelingt, die Infektion zu überwinden oder ob sich die Erreger im Organismus ausbreiten können und sich die Infektion etabliert. Parasitenantigene, welche auf der Oberfläche der Wirtszellen in Verbindung mit MHCII-Rezeptoren expremiert werden, werden zunächst CD4+-Vorläuferzellen (sogenannten Typ 0 T-Helferzellen, Th0-Zellen) präsentiert. Das zu diesem Zeitpunkt vorherrschende Zytokinmuster beeinflusst die Differenzierung der Th0-Zellen zu Typ 1 T-Helferzellen (Th1-Zellen) oder zu Typ 2 T-Helferzellen (Th2-Zellen) (BOGDAN, 1998). Bei den Th1-Zellen handelt es sich um schutzvermittelnde Zellen, die in der Lage sind, im Verlauf der Infektion intrazelluläre Abwehrmechanismen zu aktivieren und die Parasiten auf diese Weise abzutöten. Th2-Zellen führen im Rahmen einer B-Zellaktivierung zur massiven Produktion nichtprotektiver Antikörper und in diesem

Zusammenhang zur Erkrankung zahlreicher Organsysteme im Rahmen einer Immunkomplexerkrankung (GESSNER et al., 1994).

Die Entwicklung einer heilungsfördernden Th1-Population entsteht unter dem Einfluß verschiedener Zytokine. Vor allem begünstigen hohe Mengen an IFN- γ , welches von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) freigesetzt zu werden scheint - da eine hohe NK-Zellaktivität mit erhöhten IFN- γ -Spiegeln einhergeht - die entsprechende Differenzierung von Th0-Zellen. In diesem Zusammenhang übt das von Makrophagen freigesetzte IL-12 einen wesentlichen Einfluß aus. Es unterstützt die Stimulation von NK-Zellen sowie die Freisetzung von IFN- γ (D'ANDREA et al., 1992; FERRER, 2002). Neben der Produktion von IFN- γ durch lymphoide Zellen deuten einige Untersuchungsergebnisse darauf hin, daß auch Makrophagen und dendritische Zellen an der Produktion von IFN- γ beteiligt sind (FRUCHT et al., 2001).

Die besondere Bedeutung von IL-12 wird durch eine Studie von LASKAY et al. (1995) unterstrichen, bei welcher leishmanienempfindliche Mäusestämme (BALB/c Mäuse) IL-12 vor der Infektion mit *L. major* verabreicht bekamen und so eine Ausbreitung der Erreger in die Organe verhindert werden konnte. Neuere Untersuchungen ergaben, daß IL-12 auch eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunität gegen intrazelluläre Erreger zu spielen scheint (PARK und SCOTT, 2001; PARK et al., 2002).

Neben IFN- γ und IL-12 sind hohe Mengen an löslichen IL-4-Rezeptoren, die die Bioaktivität von IL-4 hemmen, zur Entstehung einer Th1-Zellpopulation begünstigend (GESSNER et al., 1994).

Th1-Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung vor allem IFN- γ und IL-2 (GESSNER et al., 1994). Die Schlüsselfunktionen von IFN- γ spiegeln sich in den Ergebnissen von vielen Studien wieder: So zeigen beispielsweise mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von experimentell infizierten, asymptomatischen Hunden nach Stimulation mit Antigen eine Produktion von IFN- γ , während symptomatische Tiere dies nicht tun (PINELLI et al., 1995). Bei normalerweise resistenten Mäusestämmen gelingt nach Verabreichung von Antikörpern gegen IFN- γ die Vermehrung der Parasiten (BELOSEVIC et al., 1989). IFN- γ ist in der Lage, die Bindung der Parasiten an die Zelloberfläche und die intrazelluläre Aufnahme zu vermindern sowie die Proliferation von Th2-Zellen zu hemmen (GAJEWSKI und FITCH,

1988; GESSNER et al., 1994). Darüber hinaus spielt IFN- γ vor allem bei der Initiation intrazellulärer Abwehrmechanismen eine entscheidende Rolle. Dieses Zytokin bewirkt die Aktivierung der intrazellulär in Makrophagen vorliegenden induzierbaren Nitrit-Oxid-Synthetase (iNOS) (BOGDAN, 1998). Potenziert wird die Wirkung von IFN- γ durch den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) (GREEN et al., 1990; LIEW und MILLOTT, 1990). Untersuchungen ergaben, daß TNF- α jedoch in Abwesenheit von IFN- γ nicht in der Lage ist, iNOS zu aktivieren (BOGDAN et al., 1990).

Die induzierbare Nitritoxidsynthetase bildet aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff Stickstoffmonoxid (NO) und Zitrullin. NO stellt den effektivsten Mechanismus zum intrazellulärem Abtöten von Leishmanien dar (GREEN et al., 1990). Das jedoch nur kurzlebige Radikal NO wandelt sich mittels Sauerstoff in Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) um (NATHAN, 1992). Die Bedeutung von iNOS wird in zahlreichen Untersuchungen deutlich: PINELLI et al. (2000) inkubierten kanine Makrophagen mit IFN- γ , TNF- α und IL-2 und konnten auf diese Weise erhöhte Werte von NO und eine erhöhte Antileishmanienaktivität nachweisen. Unter dem Zusatz eines L-Argininanalogons wurde dagegen eine Reduktion von NO ebenso wie eine erniedrigte Antileishmanienaktivität verzeichnet (LIEW et al., 1990; PINELLI et al., 2000). Makrophagen von Mäusen, deren iNOS-Gen deletiert wurde, waren nicht in der Lage, die Vermehrung von Amastigoten einzuschränken und weisen innerhalb von 24 Stunden nach Infektion eine Ausbreitung der Erreger in die viszerale Organe auf (DIEFENBACH et al., 1998). Die Aktivität von iNOS lässt sich an Hand ihrer verschiedenen Stoffwechselprodukte im Serum nachweisen. So ergab eine Studie erhöhte Zitrullinwerte im Serum von Hunden nach erfolgreicher Chemotherapie (VOULDOUKIS et al., 1996). Neben Zitrullin können auch erhöhte Spiegel an NO_2^- und NO_3^- im Serum erfasst und als Hinweis auf eine erhöhte iNOS-Aktivität gedeutet werden (PINELLI, 1996).

Neben iNOS existiert ein weiteres Enzym - die NADPH-Oxidase - intrazellulär in den Makrophagen. Nach ihrer ebenfalls zytokininduzierten Aktivierung entsteht O_2^- , H_2O_2 und OH-Radikale (GESSNER et al., 1994). Insbesondere O_2^- stellt einen äußerst effektiven Mechanismus zur intrazellulären Abtötung von Leishmanien dar (FERRER, 2002).

Liegen zum Zeitpunkt der Infektion nur relativ geringe Mengen IFN- γ und IL-12 bei einem relativ hohem IL-4-Spiegel vor, so begünstigt dieses Zytokinmuster die Entstehung einer Th2-Zellpopulation. Die Quelle für IL-4 in diesem frühen Stadium der Infektion war lange Zeit

unbekannt, jedoch scheinen CD4+CD25+ T-Zellen an der Regulation der Zytokinfreisetzung beteiligt zu sein (ASEFFA et al., 2002). IL-1 aus Makrophagen und IL-2 aus B-Zellen scheinen diese Entwicklung zu unterstützen (GESSNER et al., 1994). Ferner konnte der Einfluß von neutrophilen Granulozyten auf die Entwicklung einer Th2-Antwort nachgewiesen werden (TACCHINI-COTTIER et al., 2000).

Zu den Zytokinen, die von einer Th2-Zellpopulation gebildet werden, zählen vor allen Dingen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 (PINELLI, 1996). Sie weisen eine inhibitorische Wirkung auf Makrophagen und Zellen der Th1-Population auf (FIORENTINO et al., 1989; LIEW et al., 1989; MOSMANN und MOORE, 1991; BOGDAN, 1998). Die Freisetzung von TNF- α , NO und H₂O₂ wird gehemmt und intrazelluläre Abwehrmechanismen auf diese Weise geschwächt (CUNHA et al., 1992; BOGDAN, 1998). Eine besondere Rolle spielt das IL-4. Hohe Spiegel von IL-4 bedingen unter anderem eine herabgesetzte Empfänglichkeit gegen IL-12, da IL-4 die Expression von IL-12-Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen herab zu regulieren scheint (FERRER, 2002). Die Bedeutung von IL-4 in der Entstehung einer manifesten Erkrankung zeigt sich bei einer Untersuchung, in der eine Behandlung von IL-4-Antikörpern innerhalb der ersten 7 Tage einer Infektion zu einer Heilung führt (SADICK et al., 1990). Des weiteren zeigen im Gegensatz zu resistenten Mäusen, bei denen in einer Untersuchung aus Milz und Lymphknoten vermehrt mRNA von IFN- γ isoliert werden konnte, Mäuse mit einer chronischen nicht-heilenden Infektion ein erhöhtes Auftreten von mRNA von IL-4 (PINELLI, 1996). Neueste Untersuchungen von ALEXANDER et al. (2002) an *L. mexicana* infizierten Mäusen gaben Hinweise, daß bei chronischen, nicht heilenden Infektionen IL-13 ebenfalls eine Rolle spielt.

Neben CD4+Zellen scheinen auch CD8+Zellen in der Lage zu sein, IFN- γ , IL-2 und TNF- α zu produzieren (LOCKSLEY und SCOTT, 1991; CHAN, 1993; GESSNER et al., 1994). Somit ist eine Beteiligung dieser Zellpopulation an der Makrophagenaktivierung und Suppression von Th2-Zellen wahrscheinlich. PINELLI (1996) gelang erstmals der Nachweis einer Zellpopulation von CD8+Zellen beim Hund, die nach Antigenstimulation eine leishmanienspezifische Zytotoxizität und Sekretion von IFN- γ bedingte. Die Präsentation von leishmanienspezifischem Antigen an CD8+Zellen scheint auf eine MHC-abhängige Weise zu erfolgen (PINELLI, 1996). Ob es sich hierbei um Klasse I MHC-Moleküle handelt, konnte bisher nicht geklärt werden. Bei Mäusen ergaben Untersuchungen, daß Tiere mit einer Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD8+Zellen einen vergleichsweise

schwereren Krankheitsverlauf erlitten (GESSNER et al., 1994). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von CD8+Zellen an einer Immunitätsentwicklung ergibt die Tatsache, daß resistente Mäusestämme eine höhere CD8+Zellzahl aufweisen (MILON et al., 1986).

Neben den Zytokinen konnte die bedeutende Rolle von Mückenspeichel auf die Entwicklung des Infektionsgeschehens nachgewiesen werden. Mückenspeichel beinhaltet eine hohe Anzahl von pharmakologisch aktiven Substanzen (RIBEIRO, 1989). Hierzu zählt zum Beispiel das 7kDa Peptid „Maxidilan“ im Speichel von *Lutzomyia longipalpis*, welches vasodilatatorische und immunsuppressive Eigenschaften besitzt (LANZARO et al., 1999). Der im Mückenspeichel vorhandene „Leishmania enhancing factor“ (LEF) schränkt die Fähigkeit zur Präsentation von Antigen auf der Oberfläche von Makrophagen ein (GOTHE, 1991). MBOW zeigte 1998 in einer Studie, daß nach Verabreichung von Mückenspeicheldrüsenlysat an eigentlich resistente Mäusestämme die Produktion der Th1-Zytokine sowie IFN- γ , IL-12 und die Aktivität von iNOS inhibiert werden konnte, wobei ein gleichzeitiger Anstieg von IL-4, IL-10 und TGF- β zu verzeichnen war. Auch ohne gleichzeitige *L. major*-Infektion steigerte sich nach Zugabe von Speicheldrüsenlysat der IL-4 Spiegel.

2.3 Klinische und labordiagnostische Veränderungen

Kann nach intradermaler Inokulation von Erregern eine Infektion nicht durch eine effektive Th1-Antwort eingedämmt werden, kommt es zur Ausbreitung der Parasiten in die inneren Organe und somit zur viszerale Leishmaniose. Neben Knochenmark, Milz und Leber können auch Lymphknoten, Nieren, Bauchspeicheldrüse, Gelenke, Knochen, Augen, Lunge und Hoden betroffen sein. Histologisch ist in den betroffenen Organen häufig eine pyogranulomatöse Entzündungsreaktion mit variierender Zahl von Amastigoten nachweisbar (FERRER, 2002). Jedoch beruhen die bei der kaninen Leishmaniose auftretenden klinischen und labordiagnostischen Veränderungen nicht nur auf einer direkten Einwirkung von Parasiten auf die verschiedenen Organsysteme sondern entstehen auch indirekt unter dem schädigenden Einfluß zirkulierender Immunkomplexe im Rahmen einer Immunkomplexerkrankung (NOLI, 1999; FERRER, 2002).

Die Inkubationszeit der kaninen Leishmaniose kann zwischen mehreren Wochen und bis zu 7 Jahren variieren (TABOADA und MERCHANT, 2000).

2.3.1 Klinische Symptomatik

Im Gegensatz zu der in der Humanmedizin gebräuchlichen Einteilung der Erkrankung anhand der Erreger in die viszerale, kutane und mukokutane Leishmaniose, erfolgt beim Hund die Einteilung in die verschiedenen Formen (kutan und viszeral) aufgrund der klinischen Symptomatik. Da die Parasiten im Rahmen der kaninen Leishmaniose jedoch immer intrazellulär in den Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) vorliegen, handelt es sich im engeren Sinne grundsätzlich um eine viszerale Erkrankungsform (MORITZ und STEUBER, 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang die von MORITZ et al. (1999) in einer Studie beobachtete Feststellung, daß Hunde mit kutanen Symptomen mit Titern von 1:40 bis 1:512 einen niedrigeren Antikörper-Titer aufzuweisen scheinen, als Tiere mit viszeraler Beteiligung, bei denen die Titer zwischen 1:512 bis 1:2560 variieren.

Die prozentuale Verteilung einzelner klinischer Symptome wurde in zahlreichen Studien erfasst (SLAPPENDEL, 1988; OPITZ, 1996; CIARAMELLA et al., 1997; GOTHE, 1991). Diese sind in Tabelle 2 in einer Übersicht dargestellt.

Tabelle 2: Prozentuale Häufigkeit klinischer Symptome bei der kaninen Leishmaniose (nach NOLI, 1999)

Symptom	Häufigkeit (%)
Generalisierte, symmetrische Lymphknotenvergrößerung	71,2 – 96,1 %
Veränderungen der Haut	75,0 – 89,0 %
Blasse Schleimhäute	58,0 – 94,4 %
Gewichtsverlust	30,7 – 70,0 %
Fieber	23,0 – 70,0 %
Lethargie, Anorexie	18,0 – 70,0 %
Splenomegalie	15,0 – 53,3 %
Augenveränderungen	16,0 – 50,0 %
Niereninsuffizienz	16,0 – 32,0 %
Epistaxis	10,0 – 37,0 %
Arthropathien	4,0 – 4,6 %
Diarrhoe	3,0 %
Akute Form: Fieber, Lymphknotenvergrößerung	4,0 %
Schweres Nierenversagen ohne Hautveränderungen	4,0 %

Das am häufigsten zu diagnostizierende Symptom stellt eine lokalisierte oder generalisierte Vergrößerung der Lymphknoten dar, die in bis zu 96 % der Fälle vorliegt. Durch die häufig im Bereich des Kopfes auftretenden, schwerwiegenden Hautveränderungen können Lymphknoten dieser Lokalisation schwerwiegender betroffen sein als Lymphknoten übriger Körperregionen (CIARAMELLA et al., 1997). Zytologisch ist die Lymphadenopathie durch ein vermehrtes Auftreten von Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen gekennzeichnet. Gegebenenfalls können Erreger in den Makrophagen nachgewiesen werden.

Bei bis zu 89 % der Tiere können außerdem vielfältige Hautveränderungen festgestellt werden. Neben trockener, exfoliativer Dermatitis, die sich in der Bildung von Schuppen äußert und bei bis zu 90 % der Patienten mit einer kutanen Symptomatik vorliegt, treten Ulzera – insbesondere an Ohren und Nase - auf. Diese sind zum einen Hinweis auf eine

direkte Schädigung der Haut durch die Parasiten. Sie können aber auch im Rahmen einer immunkomplexbedingten Vaskulitis entstehen. SLAPPENDEL et al. (1988) gelang bei Tieren mit entsprechenden Hautveränderungen der Nachweis erhöhter Konzentrationen von Kryoglobulinen im Serum. Diese führen bei kalter Witterungslage zu lokaler Ischämie und Nekrose und begünstigen somit die Bildung von Ulzera (TABOADA und MERCHANT, 2000). Hautknoten ohne Ulzera, die bei histologischer Untersuchung eine hohe Anzahl von Amastigoten aufweisen können (CIARAMELLA et al., 1997), liegen bei bis zu 16 % der Patienten mit Hautveränderungen vor. Diffuse Alopezie und lokalisierte periorbitale Alopezie können weitere Anzeichen einer Hautmanifestation der Leishmaniose sein. Darüber hinaus können Paronychie, eine sterile, pustulöse Dermatitis, nasale Depigmentation sowie nasale oder digitale Hyperkeratose beobachtet werden. Die bei bis zu 54 % der Hunde auftretende Onychogrypose ist häufig mit dem Auftreten brüchiger und spröder Krallen vergesellschaftet und Ausdruck einer Infektion des Nagelbettes (GOTHE, 1991). Die prozentuale Häufigkeit der Hautveränderungen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Prozentuale Häufigkeit der Hautveränderungen bei der kaninen Leishmaniose (nach NOLI, 1999)

Art der Hautveränderungen	Häufigkeit (%)
Exfoliative Dermatitis	56,0 – 90,9 %
Ulzerative Hautveränderungen	32,8 – 40,0 %
Periorbitale Alopezie	18,0 %
Diffuse Alopezie	14,0 %
Onychogrypose	24,0 – 54,5 %
Paronychie	13,6 %
Sterile, pustulöse Dermatitis	1,6 – 13,6 %
Nasale Depigmentation	4,5 %
Nasale / digitale Hyperkeratose	4,5 %
Nicht-ulzerierende Hautknoten	4,5 – 16,8 %

Pathologisch-histologische und immunzytochemische Untersuchungen von Hautveränderungen durch FONDEVILA et al. (1997) deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß von Hautveränderungen und der Immunkompetenz des Wirtes hin. Erfasst wurde bei diesen Untersuchungen unter anderem die Anzahl von Langerhanszellen, Makrophagen, T-Zellen und Parasiten in veränderten Hautbereichen. Hunde mit dem klinischen Symptom einer Alopezie scheinen demnach die Erreger effektiv kontrollieren zu können, während Tiere mit nodulären Veränderungen hierzu nicht in der Lage sind.

Die überwiegende Mehrheit der Patienten weist blasse Schleimhäute auf. Sie sind im Rahmen der Leishmaniose in der Regel Zeichen einer hyporegenerativen Anämie.

Nierenveränderungen, die die häufigste Todesursache dieser Erkrankung darstellen (TABOADA und MERCHANT, 2000), beruhen in der Regel auf einer chronischen Glomerulonephritis. Zirkulierende Immunkomplexe spielen bei ihrer Entstehung eine wesentliche Rolle. Ablagerungen von IgG, IgM und C3 konnten in diesem Zusammenhang sowohl glomerulär als auch tubulär durch immunhistologische Untersuchungen nachgewiesen werden (MANCIANTI et al., 1989; POLI et al., 1991). Bei einigen Patienten werden Ablagerungen von Amyloid in der Niere beobachtet (GEORGE et al., 1976; POLI et al., 1991). Der Verdacht, daß antinukleäre Antikörper für die Schädigung der Niere verantwortlich sein könnten, wurde in einer Studie von LUCENA et al. (1996) nicht bestätigt. In dieser Untersuchung wiesen Patienten mit einer Nierenfunktionsstörung keinen signifikant höheren Spiegel antinukleärer Antikörper auf.

Neben der chronischen Niereninsuffizienz stellt auch die chronische Enteritis eine häufige Todesursache dar (NOLI, 1999). Insbesondere werden hierbei Entzündungen des Colons beobachtet (GONZALES et al., 1990; FERRER et al., 1991). Aber auch akute, hämorrhagische Enteritiden treten als Folge einer Niereninsuffizienz oder durch direkte Einwirkung von Parasiten auf (NOLI, 1999).

Bei bis zu 50 % der Patienten sind Augenveränderungen zu verzeichnen. In diesem Zusammenhang können Keratokonjunktivitiden, Blepharokonjunktivitiden, Uveitiden, die Glaukombildung nach sich ziehen können (FERRER, 1999), und Panophtalmitiden diagnostiziert werden. CIARAMELLA et al. (1994) wiesen im Zusammenhang mit Panophtalmitiden granulomatöse Entzündungen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Parasiten

in allen Strukturen des Auges nach. Vollständige Erblindung kann die Folge sein (GOTHE, 1991). Durch Befall und Zerstörung des Tränenapparates kommt es zur Austrocknung der Hornhaut und der Bindehaut, wodurch pathologische Prozesse in ihrer Entwicklung unterstützt werden (CIARAMELLA et al., 1997). Ferner konnten diffuse Ablagerungen von IgG in zahlreichen Strukturen des Auges nachgewiesen werden, so daß hier eine immunpathologische Komponente wahrscheinlich erscheint (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

Die bei vielen Hunden im Rahmen der Leishmaniose auftretenden Bewegungsstörungen sind in der Regel im Bereich der Gelenke lokalisiert und entzündlichen Ursprungs. Lahmheiten treten vor allen Dingen auf Grund einer immunvermittelten Polyarthrititis auf. Darüber hinaus werden auch degenerative Veränderungen der Gelenke beobachtet, bei denen Gelenksoberflächen vollständig zerstört und Knochenstrukturen aufgelöst werden können (WOLSCHRIJN et al., 1996). Ein Nachweis von Erregern in der Gelenksflüssigkeit ist gegebenenfalls möglich (BURACCO et al., 1997). Außerdem treten Veränderungen im Bereich der Muskulatur auf. Hierbei handelt es sich ebenfalls vor allem um entzündliche Prozesse, aber auch atrophische Veränderungen werden oft beobachtet. VAMVAKIDIS et al. (2000) untersuchten Hunde mit Atrophien der Kau- und Skelettmuskulatur. In der histologisch-pathologischen Untersuchung fanden sich neben Atrophie und Nekrose von Muskelfasern mononukleäre Infiltrate und neutrophile Vaskulitiden. Bei einigen Hunden konnten Leishmanien in Makrophagen nachgewiesen werden. Außerdem gelang der Nachweis von IgG-Immunkomplexen und zirkulierenden Antikörpern gegen Myofibrillen bei allen Hunden der Untersuchung. BRANDONISIO et al. (1990) fanden im Serum von leishmaniosekranken Hunden sogar Antikörper gegen Herzmuskelzellen und gegen Muskelzellen der glatten Muskulatur.

Bei bis zu 32 % der erkrankten Hunde tritt Epistaxis auf. Ursächlich kommen hierfür neben einer Thrombozytopenie Veränderungen im Bereich der Nasenschleimhaut oder ein Hyperviskositätssyndrom aufgrund einer Hyperglobulinämie mit Störung der Fibrinvernetzung in Betracht.

Bei vielen Tieren treten im Krankheitsgeschehen begleitend zu den bisher erwähnten Symptomen weitere unspezifische Symptome auf, die als Folge von Organerkrankungen zu bewerten sind. Hierzu zählen beispielsweise Abmagerung, Anorexie, deutlicher

Leistungsabfall, Fieber und Splenomegalie. In einigen Fallberichten werden außerdem atypische Symptome wie akute Pankreatitiden, systemische Vaskulitiden, Thrombosen sowie Veränderungen des respiratorischen und kardiovaskulären Systems beschrieben (PUMAROLA et al., 1991; CARRASCO et al., 1997; BLAVIER et al., 2001).

2.3.2 Labordiagnostische Veränderungen

Die im Rahmen der kaninen Leishmaniose auftretenden labordiagnostischen Veränderungen sind vielfältig und als Ausdruck akuter oder chronischer Schädigung der Organe durch direkte Parasiteneinwirkung oder durch Immunkomplexe zu bewerten. Tabelle 4 fasst die prozentuale Häufigkeit labordiagnostischer Veränderungen zusammen.

Tabelle 4: Prozentuale Häufigkeit labordiagnostischer Veränderungen bei der kaninen Leishmaniose (nach NOLI, 1999)

Labordiagnostische Befunde	Häufigkeit (%)
Hyperproteinämie	63,3 – 91 %
Hyperglobulinämie	70 – 100 %
Hypoalbuminämie	68 – 94 %
Anämie (hyporegenerativ)	21 – 94,2 %
Thrombozytopenie	29,3 – 50 %
Leukozytopenie	22 %
Leukozytose mit Linksverschiebung	8 – 24 %
erhöhte Nierenwerte	38 – 45 %
erhöhte Leberenzyme	16 – 61 %
Proteinurie	29 – 91 %

Insbesondere werden Veränderungen im Proteinstoffwechsel der Patienten beobachtet. So wurde in einer Studie von CIARAMELLA et al. (1997) bei über 70 % der Tiere eine Hyperglobulinämie nachgewiesen. Diese tritt bei Tieren mit einer unzureichenden Th1-Antwort im Zusammenhang mit einer gesteigerten B-Zellaktivierung auf. Mittels Serumelektrophorese kann sowohl ein Anstieg der γ -Globuline als auch der β -Globuline

verzeichnet werden. Oft resultiert aus der Erhöhung der Globulinfraction ein erhöhtes Gesamtprotein, welches auf bis zu 130 mg/l ansteigen kann. Eine gleichzeitig bestehende Hypoalbuminämie vermag diesen Befund allerdings zu verdecken. Diese tritt im Rahmen eines renalen oder enteralen Protein-Verlust-Syndroms auf oder ist auf die unzureichende Bildung von Albumin durch eine in ihrer Funktion beeinträchtigte Leber zurückzuführen. Mangelernährung kann ebenfalls eine Rolle spielen (NOLI, 1999).

MARTINEZ-SUBIELA et al. (2002) untersuchten Serumkonzentrationen von Akutphase-Proteinen (C-reaktives Protein, Haptoglobin und Ceruloplasmin) bei leishmaniosekranken Hunden und konnte eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Tieren feststellen. Des Weiteren wiesen symptomatische Patienten eine signifikant höhere Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins auf als asymptomatische Hunde.

Durch Infektion des Knochenmarkes kann die Differenzierung und Reifung der Zellreihen gestört sein. Neben Leukozytopenien sind vor allen Dingen auch Thrombozytopenien und Anämien zu verzeichnen. Während hyporegenerative Anämien Ausdruck einer chronischen Niereninsuffizienz sein können, sind nicht-regenerative Anämien in der Regel als Begleit-anämie chronischer Erkrankungen zu bewerten. Eine gleichzeitig bestehende Infektion mit Ehrlichien kann die Symptomatik verstärken und die Prognose in Bezug auf das Regenerationsvermögen des Knochenmarkes deutlich verschlechtern. Bei einigen Tieren kann eine Leukozytose mit Linksverschiebung beobachtet werden (CIARAMELLA et al., 1997).

Durch Schädigung der Nieren auf Grund zirkulierender Immunkomplexe treten neben den bereits erwähnten renalen Eiweißverlusten, die sich als Proteinurie feststellen lassen, auch erhöhte Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin im Serum auf. LOPEZ et al. (1996) konnten bei infizierten Hunden mit einer Kreatininerhöhung signifikant höhere Spiegel von auf IgG basierenden zirkulierenden Immunkomplexen nachweisen, als bei infizierten Hunden mit Kreatininwerten im Normalbereich.

Ist die Leber ins Krankheitsgeschehen einbezogen, sind insbesondere Erhöhungen der Leberenzymaktivitäten im Blutplasma zu verzeichnen. Jedoch konnten bei leishmaniosekranken Hunden auch signifikant erhöhte Konzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden nachgewiesen werden. Immunkomplexablagerungen in der Leber oder Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit im Cholesterinmetabolismus scheinen eine

signifikante Erhöhung von LDL-Cholesterin bei gleichzeitiger signifikanter Erniedrigung von HDL-Cholesterin zu bedingen (NIETO et al., 1992).

2.3.3 Differentialdiagnosen

Aufgrund der vielfältigen Symptomatik sind bei der kaninen Leishmaniose eine große Anzahl von Differentialdiagnosen in Betracht zu ziehen. Dies gilt insbesondere für die zahlreichen Veränderungen der Haut. So ähneln beispielsweise Dermatitisen, die mit periorbitaler Alopezie vergesellschaftet sein können, vor allem dem klinischen Bild einer Demodikose. Jedoch müssen in diesem Zusammenhang auch Pyodermien differentialdiagnostisch abgeklärt werden (NOLI, 1999). Patienten, die unter einem Lupus erythematoses leiden, weisen häufig ulzerative Hautveränderungen auf. Diese können im Fall einer systemischen Erkrankung sogar gemeinsam mit Polyarthritiden und Glomerulonephritiden auftreten. Hier wird der Ausschluß der Differentialdiagnose insbesondere durch die Tatsache erschwert, daß viele leishmaniosekrankte Hunde antinukleäre Antikörper und einen positiven Test auf Lupus-erythematosus-Zellen aufweisen (SLAPPENDEL, 1988). Weiterhin lassen sowohl ulzerierende als auch nicht ulzerierende Hautknoten an Neoplasien denken (NOLI, 1999).

Tumoröse Veränderungen – z.B. im Sinne eines malignen Lymphoms – dürfen bei Vergrößerungen der Lymphknoten differentialdiagnostisch nicht außer Acht gelassen werden.

Bei Vorliegen einer Thrombozytopenie muß eine Ehrlichiose differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß bei gleichzeitiger Infektion mit beiden Erregern besonders schwerwiegende hämatologischen Veränderungen existieren können.

Allgemein bleibt zu bedenken, daß auf Grund einer häufig bei der Leishmaniose vorliegenden Immunschwäche Folgeerkrankungen auftreten können, die die Abgrenzung von den Differentialdiagnosen erschweren oder unmöglich machen.

2.4 Erregernachweis

Da Hunde als Erregerreservoir der humanen Leishmaniose gelten und die Erkrankung auf Grund ihres Zoonosepotentials von besonderer Bedeutung ist, spielt ein zuverlässiger Erregernachweis in der tierärztlichen Praxis eine wichtige Rolle. Dieser sollte neben der Identifizierung infizierter Hunde auch die Überwachung des Therapieerfolges bei bereits

behandelten Patienten mit möglichst hoher Spezifität und Sensitivität gewährleisten. Insbesondere in Fällen mit entsprechenden klinischen und labordiagnostischen Veränderungen, bei denen sich der anamnestische Hinweis auf einen Aufenthalt in endemischen Gebieten ergibt, muß die Erkrankung differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden. Zur Abklärung der Verdachtsdiagnose stehen dem Tierarzt verschiedene indirekte und direkte Nachweisverfahren zur Verfügung. Hierzu zählten neben der Bestimmung des Antikörper-Titers der direkte Nachweis von Erregern in geeigneten Organpunkaten bzw. -biopaten mittels Zytologie oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Ein direkter Nachweis von Parasiten nach vorheriger Anzucht in einem geeigneten Kulturmedium stellt ebenfalls eine geeignete Nachweismethode dar.

Die Diagnosestellung sollte nicht anhand der klinischen Symptomatik und labordiagnostischer Veränderungen erfolgen, da diese Veränderungen sehr unspezifisch sind und für eine Vielzahl von Differentialdiagnosen in Frage kommen können. Darüber hinaus weist ein hoher Prozentsatz infizierter Tiere keine Symptome auf (NOLI, 1999). In Einzelfällen können außerdem atypische Formen beobachtet werden, so daß bei diesen Patienten die Erkrankung unerkannt bleiben würde (GRADONI, 2002).

Der häufig in endemischen Gebieten eingesetzte **Formol-Gel-Test**, bei dem 5 ml Serum mit einem Tropfen 30%igem Formaldehyd versetzt werden, eignet sich ebenfalls nicht zum Erregernachweis. Eine einsetzende opake Trübung deutet lediglich auf das Vorliegen großer Mengen labiler Immunglobuline von IgG und IgM hin. Da dieser Befund auch bei anderen Infektionskrankheiten positiv sein kann, weist diese Methode eine zu geringe Spezifität auf. Falsch negative Ergebnisse können in den ersten 3 Monaten nach Infektion auftreten (CHOWDHURY et al., 1992).

Die sogenannte **Xenodiagnose** stellt ein sehr aufwendiges Nachweisverfahren mittels blutsaugender Insekten dar. Dazu wird der sedierte Hund Schmetterlingsmücken zur Blutmahlzeit ausgesetzt und diese im Anschluß auf die Erreger untersucht. Da Schmetterlingsmücken allerdings nicht kommerziell erhältlich sind und die Durchführung sehr aufwendig ist, findet dieses Verfahren bisher nur in Einzelfällen Einsatz. Jedoch scheint diese Methode Aufschluß über zahlreiche epidemiologische Fragestellungen zu geben. So ergaben beispielsweise Untersuchungen, daß die Infektiösität eines infizierten Hundes mit der

Höhe seines Antikörpertiters zu korrelieren scheint. Vor Serokonversion war kein Hund gegenüber den angesetzten Insekten infektiös (GRADONI, 2002).

2.4.1 Indirekter Erregernachweis

2.4.1.1 Serologie

Die Untersuchung des Serums auf das Vorhandensein und die Konzentration von Antikörpern gegen die Erreger stellt die am häufigsten verwendete Methode in der Diagnostik der kaninen Leishmaniose dar (GRADONI, 1999). Hierbei stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Neben Unterschieden in der Handhabung müssen vor allem Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität bei der Auswahl der Methode bedacht werden.

Als „Goldener Standard“ gilt in der Serologie zur Zeit der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT). In diesem relativ aufwendigen Verfahren können die Antikörper mittels fluoreszierender Anti-Antikörper markiert und anschließend quantitativ bestimmt werden. In zahlreichen Studien getestet, weist diese Methode bei einer Sensitivität von bis zu 100 % auch eine Spezifität von bis zu 100 % auf (MANCIANTI et al., 1996; BERNADINA et al., 1997; KOUTINAS et al., 2001).

Neben der indirekten Immunfluoreszenz spielt der sogenannte Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) als indirektes Nachweisverfahren ebenfalls eine wichtige Rolle. Hierbei erfolgt die Bestimmung des Antikörpertiters mittels Enzym-markierten Anti-Antikörpern. Nach Zugabe einer chromogenen, farblosen Substanz wird diese durch die Enzymaktivität in ein farbiges Endprodukt umgesetzt, welches photometrisch bestimmt werden kann. SCALONE et al. (2002) entwickelten zum Nachweis einer Infektion mit *L. infantum* bei Hunden ein standardisiertes ELISA-Verfahren, welches auf der Verwendung des rekombinanten K39 Antigen basiert. Bei diesem Antigen handelt es sich um ein Protein, welches mit Mikrotubuli assoziiert ist. Hohe Übereinstimmungen der Ergebnisse von IFAT und ELISA konnten in dieser Untersuchung nachgewiesen werden.

Die in ihrer Handhabung meist sehr einfach und schnell durchzuführenden dot-ELISA-Verfahren, bei denen das Probenmaterial auf eine mit Antigen beschichtete Nitrozellulosemembran aufgetragen wird, weisen in Untersuchungen von GREINER et al. (1993) und VERCAMMEN et al. (1998) im Vergleich zum konventionellen

Mikrotiterplatten-ELISA und IFAT eine hohe Korrelation in ihren Ergebnissen auf und scheinen somit für eine Diagnosestellung geeignet zu sein.

Ein aufwendigeres Verfahren zum Nachweis von Antikörpern stellt die Western-Blot Methode dar. Proteinmoleküle werden mittels Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Nach Zugabe der Serumantikörper können diese im Anschluß an eine Reaktion mit Anti-Antikörpern identifiziert werden. Von Vorteil ist bei diesem Verfahren unter anderem die Möglichkeit zur Darstellung niedriger Titer von Antikörpern, die spezifisch für Polypeptidfraktionen mit geringem Molekulargewicht (12 und 14 kD) von *L. infantum* sind. Diese scheinen bereits in den frühen Phasen der Infektion vertreten zu sein und ermöglichen in diesem Zusammenhang eine Diagnosestellung in einem frühen Erkrankungsstadium (AISA et al., 1998). BERRAHAL et al. (1996) untersuchten asymptomatische Hunde mittels Immunoblotting, Polymerase-Ketten-Reaktion, Immunfluoreszenz und ELISA. Während Immunfluoreszenz-Verfahren und ELISA negative Ergebnisse erbrachten, erwiesen sich sowohl die PCR als auch das Immunoblotting als geeignete Verfahren, asymptomatische Trägartiere zu identifizieren.

Der sogenannte Latex-Agglutinationstest (LAT) weist durch Agglutination von Latexkügelchen, die mit entsprechenden Antigenen beschichtet sind, auf das Vorliegen von Antikörpern im Patientenserum hin. DEREURE et al. (1998) entwickelten ein Testverfahren mit löslichem Antigen von *L. infantum* und stellten im Vergleich zum indirekten Immunfluoreszenz-Verfahren nach Untersuchung von über 1.000 Hunden eine Sensitivität von 93,4% fest. Jedoch scheinen im Rahmen von Verlaufskontrollen im Vergleich zu anderen serologischen Verfahren (insbesondere IFAT) bereits zu früh negative Titer aufzutreten (DENEROLLE und BOURDOISEAU, 1999).

Aufgrund der meist einfachen, schnellen und preiswerten Durchführbarkeit und der relativ hoch erscheinenden Sensitivität und Spezifität ist der Einsatz serologischer Verfahren zur Diagnostik der Leishmaniose beim Hund weit verbreitet und sinnvoll. Jedoch grenzen häufig auftretende falsch-negative und falsch-positive Befunde die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode deutlich ein. Insbesondere in der Zeitspanne zwischen Infektion und Serokonversion, die verzögert erst mehrere Monate nach der Infektion auftreten kann, liegen häufig falsch-negative Ergebnisse vor (GRADONI, 2002). Falsch-negative Ergebnisse

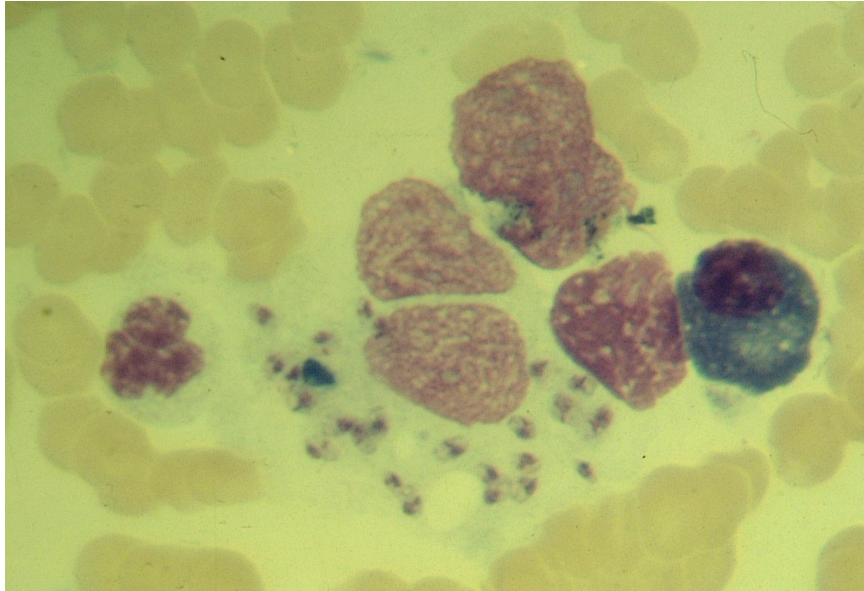
können auch bei Tieren festgestellt werden, die nicht zu einer ausreichenden Serokonversion in der Lage sind (GASKIN et al., 2002). Bei Verdacht auf falsch-negative Befunde wird eine Wiederholung der Untersuchung in 6-8 Wochen angeraten (NOLI, 1999). Antikörper-Titer bleiben nach klinischer Genesung häufig weiterhin erhöht und eignen sich daher nicht zur Kontrolle des Therapieerfolges (FERRER et al., 1995; GINEL et al., 1998; NOLI, 1999). Zur serologischen Verlaufskontrolle scheint allerdings die Bestimmung von spezifischem IgG1 und IgG2 geeignet zu sein. DEPLAZES et al. (1995) konnten bei *L. infantum* infizierten Hunden, die keine Krankheitssymptome zeigten, erhöhte IgG2-Spiegel nachweisen. Dagegen zeigten Patienten, die trotz Therapie klinische Symptome aufwiesen, erhöhte IgG1-Spiegel. In Bezug auf die serologische Diagnostik von Patienten, die aus Südamerika stammen, dürfen mögliche Kreuzreaktionen mit Trypanosomen nicht außer Acht gelassen werden (GRADONI, 2002; GASKIN et al., 2002).

2.4.2 Direkter Erregernachweis

2.4.2.1 Mikroskopischer Nachweis

Der direkte mikroskopische Nachweis von Parasiten gilt als „goldener Standard“ in der Diagnostik der kaninen Leishmaniose (GESSNER et al., 1994; GRADONI, 2002). Zytologische bzw. histologische Präparate insbesondere von Knochenmark und Lymphknoten aber auch von Leber, Milz und Haut können in Abhängigkeit von der klinischen Symptomatik zur Beurteilung herangezogen werden. Nach geeigneter Färbung der Präparate (z.B. mittels Giemsa, Pappenheim oder Leishman) sind die Parasiten als intrazellulär vorliegende, 2 - 5 µm große Strukturen erkennbar, die neben dem Zellkern durch das Vorliegen eines stäbchenförmigen Kinetoplasten charakterisiert sind (GESSNER et al., 1994). Abbildung 2 zeigt den Befall von Makrophagen mit Leishmanien in einer Knochenmarkzytologie.

Abbildung 2: Kanine Leishmaniose (Patient Nr. 2): direkter mikroskopischer Erregernachweis, Knochenmarkzytologie: mittelgradiger Befall von Makrophagen, Entzündungszellen: neutrophile Granulozyten, Plasmazelle (May-Grünwald-Giemsa, Original-Vergrößerung 1000x)



Bei einer sehr hohen Spezifität weist dieses Verfahren jedoch nur eine geringe Sensitivität auf. Diese wird für das Knochenmark mit ca. 60 % und für Lymphknoten nur mit ca. 30 % angegeben, (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999). Die Ursache hierfür scheint in der meist nur geringen Anzahl von Parasiten in den Präparaten zu liegen (CIARAMELLA et al., 1997). Schwankende Erregerzahlen in den einzelnen Präparaten erschweren zudem die Diagnosestellung. Darüber hinaus kann es schwierig sein, Reste von pyknotischen Zellkernen und Zelltrümmern von Mikroorganismen in den Makrophagen zu differenzieren (GASKIN et al., 2002). Eine von FERRER et al. (1988) eingesetzte Färbemethode mittels Immunperoxidase färbt die Erreger selektiv an und erleichtert in diesem Zusammenhang ihre Identifizierung. Erfahrung des Untersuchers sowie die aufgewendete Untersuchungszeit und die Qualität der Probe beeinflussen ebenfalls in hohem Maße das Ergebnis der Untersuchung (NOLI, 1999). Eine Verbesserung der Sensitivität kann nach vorheriger Anzüchtung der Erreger in einem geeigneten Medium (z.B. Novy-McNeal-Nicolle-Medium oder Roswell Park Memorial Institute-Medium) erzielt werden. Die zytologische Untersuchung von Knochenmarkspunktaten erreicht auf diese Weise eine Sensitivität von 81 %.

Bei der mikroskopischen Beurteilung zytologischer bzw. histologischer Präparate muß immer bedacht werden, daß kein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Leishmanien im Präparat und dem Schweregrad der klinischen Symptomatik hergestellt werden kann (GOTHE, 1991; NOLI, 1999). Außerdem eignet sich ein negativer zytologische Befund nicht zur Kontrolle des Therapieerfolges (MORITZ und STEUBER, 1999).

2.4.2.2 Kulturelle Anzüchtung

Der Nachweis von promastigoten Erregern nach kultureller Anzüchtung aus geeignetem Probenmaterial stellt neben dem direkten mikroskopischen Nachweis ebenfalls einen „goldenen Standart“ in der Diagnostik der Leishmaniose dar (GRADONI, 2002). Als Probenmaterial eignen sich vorzugsweise Biopate und Aspiate aus Knochenmark, Milz und Lymphknoten. Das gewonnene Probenmaterial sollte zur Anzucht auf mehrere Ansätze verteilt werden. Auf diese Weise scheinen bessere Ergebnisse erzielt werden zu können, als bei Ansatz einer einzigen Kultur mit einer großen Probenmenge. In Lymphknotenaspiraten erhöhte GRADONI (2002) die Sensitivität dieses Nachweisverfahrens durch Verwendung von Proben aus Lymphknoten verschiedener Lokalisationen eines Tieres.

Als geeignete Kulturmedien gelten für dieses Nachweisverfahren vor allem das NNN-Medium (Novy-McNeal-Nicolle-Medium) und das RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute-Medium). Unter optimalen Bedingungen kann die kulturelle Anzüchtung von Leishmanien aus Knochenmark und Lymphknoten eine Sensitivität von nahezu 100 % erreichen (GRADONI, 2002). Im Vergleich zur mikroskopischen Untersuchung weist dieses Verfahren somit eine deutlich höhere Sensitivität auf (PIARROUX et al., 1994; MATHIS und DEPLAZES, 1995).

Die Möglichkeit - nach kultureller Anzucht von Erregern - eine Überprüfung von Resistenzen sowie eine Analyse des Isoenzymmusters durchführen zu können, stellt einen großen Vorteil gegenüber anderen diagnostischen Methoden dar (GRAMICCIA et al., 1992; MATHIS und DEPLAZES, 1995; NOLI, 1999).

Der Einsatz der Anzüchtung wird oft durch die hohen Kosten und die Notwendigkeit eines spezialisierten Labors eingeschränkt (MATHIS und DEPLAZES, 1995; NOLI, 1999). Häufig minimiert zudem die lange Zeitspanne bis zum Vorliegen der Ergebnisse die Einsatzmöglichkeiten. Diese beträgt in der Regel 3 – 4 Tage. Gegebenenfalls liegen Befunde

jedoch erst nach 10 Tagen vor (MATHIS und DEPLAZES, 1995). Die Notwendigkeit frischen Probenmaterials stellt ebenso einen Nachteil dieser Methode dar, wie die Einschränkung des Gelingens durch bakterielle Kontamination des Probenmaterials, (MATHIS und DEPLAZES, 1995; STEUBER et al., 1997).

2.4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, welches auf der Verfielfältigung und dem Nachweis selektiver DNA-Abschnitte des Parasiten mittels thermostabiler Polymerase und spezifischer Primer beruht. Als geeignetes Probenmaterial zur Isolierung von Erregererbgut gelten vor allem Punktate von Knochenmark und Lymphknoten. Jedoch können auch Proben von Leber, Milz und Haut sowie peripheres Blut Verwendung finden (NOLI, 1999; FISA et al., 2001). Da nur geringe Mengen der Erreger zum Nachweis erforderlich sind, stellt diese Methode eine sehr spezifisches und sensibles Diagnostikum dar (RODGERS et al., 1990). Sensitivität und Spezifität werden für die PCR mit bis zu 100 % angegeben (ASHFORD et al., 1995; MATHIS und DEPLAZES, 1995; ROURA et al., 1999).

Basierend auf der Verwendung verschiedener Primer wurden zahlreiche PCR-Protokolle entwickelt. Hierbei zeigen die unterschiedlichen Leishmanienstämme Abweichungen in der Sensitivität. STEUBER et al. (1997) analysierten die Sensitivität von *L. infantum* bezüglich zweier PCR-Protokolle mittels Verdünnungsreihen. Die Methode nach PIARROUX (1993) - beruhend auf der Erzeugung eines 100-Basenpaar(bp)-Amplifikates - ermöglichte den Nachweis eines einzelnen Erregers in Anwesenheit von 10^5 Leukozyten. Das Protokoll von RAVEL (1995) wies dagegen eine geringere Sensitivität auf. Das Amplifikat mit einer Länge von 700 bp konnte nur bei Vorliegen von 10 Erregern auf 10^5 Leukozyten nachgewiesen werden. Jedoch ermöglicht letzteres Protokoll neben dem Nachweis von *L. infantum* auch den Nachweis eines Amplifikates von *L. major*.

Die PCR eignet sich sowohl zur Erkennung der Erkrankung in frühen Stadien (PIARROUX et al., 1993; ADHYA et al., 1995; MATHIS und DEPLAZES, 1995; BERRAHAL et al., 1996), als auch zur Kontrolle des Therapieerfolges (LACHAUD et al., 2000). Die Persistenz der Erreger lässt sich nach Therapie insbesondere in Knochenmarkspunktaten nachweisen (STEUBER et al., 1997). Sogar bei Patienten, die über Jahre keine klinischen Symptome mehr gezeigt haben, ist ein Erregernachweis möglich (BERRAHAL et al., 1996).

In vielen Studien wird die Sensitivität der PCR mit der Sensitivität anderer Nachweismethoden verglichen. MATHIS et al. (1996) geben mit einer Sensitivität der PCR von 100 % eine sehr gute Übereinstimmung mit der kulturellen Anzucht an. Der Vorteil der PCR liegt jedoch nach Meinung der Autoren in der kürzeren Zeitspanne bis zum Vorliegen der Ergebnisse. Während die kulturelle Anzucht einen Zeitraum von 3 - 10 Tagen in Anspruch nimmt, kann das Ergebnis der PCR bereits nach 1 Tag zur Verfügung stehen (MATHIS und DEPLAZES, 1995). Vergleicht man die Sensitivität serologischer Verfahren mit der Sensitivität der PCR, so weisen zahlreiche Untersuchungen auf eine höhere Sensitivität der PCR hin (ASHFORD et al., 1995; ADHYA et al., 1995; LACHAUD et al., 2000). Dies ist insbesondere für immunsupprimierten Patienten mit einem Unvermögen zur Serokonversion von Bedeutung, da für sie eine sichere Diagnosestellung mittels PCR unverzichtbar erscheint (PIARROUX et al., 1994; STEUBER et al., 1998). Außerdem können Reihenuntersuchungen in endemischen Gebieten unter Einsatz serologischer Verfahren zu einer Unterschätzung der Infektionsrate führen (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LEONTIDES et al., 2002).

Die Einsatzmöglichkeit der PCR als zuverlässige Methode zum direkten Nachweis von Erregern wird durch die Notwendigkeit eines spezialisierten Labors häufig verringert. Darüber hinaus entstehen in der Regel für den Besitzer höhere Kosten und die Probengewinnung (v.a. Knochenmark) kann sich unter Umständen als schwierig erweisen. Geringe Erregerzahlen in den Proben können den Nachweis erschweren und unter Umständen ein falsch negatives Ergebnis bewirken. Dies gilt insbesondere bei Verwendung von peripherem Blut (FISA et al., 2001). Eine Verbesserung der Ergebnisse zeigte sich jedoch nach Verwendung eines Kulturmediums zum Transport der Proben in das ausführende Labor im Vergleich zu tiefgefrorenen Proben (STEUBER et al., 1997). FISA et al. (2001) entwickelten eine sogenannte „Nested PCR“, die eine Sensitivität von nahezu 100% für den Nachweis von Erregern im peripheren Blut erbrachte. Werden in endemischen Gebieten Konjunktival- oder Hauttupfer zur Untersuchung hoher Patientenzahlen verwendet, können falsch positive Befunde durch „Kontamination“ der Haut und Schleimhäute mit Erregern auftreten, ohne daß eine manifeste Infektion vorliegt (GRADONI, 2002).

2.5 Therapie und Prophylaxe

2.5.1 First line drugs

2.5.1.1 5-wertige Antimonpräparate

Antimonpräparate wurden im Jahre 1912 in Südamerika zum ersten Mal zur Behandlung der Leishmaniose eingesetzt (BANETH, 2002). Sie spielen heute als Mittel der Wahl (first line drugs) zur Behandlung der kaninen Leishmaniose eine zentrale Rolle.

Der Wirkungsmechanismus der zur Verfügung stehenden Präparate N-Methylglucamin-Antimoniats (Glucantime[®], Rhône Mérieux) und Natrium-Stibogluconat (Pentostam[®], Wellcome) ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Die leishmanizide Wirkung scheint auf einer Energieverarmung der Parasiten nach Blockade der glykolytischen Enzyme (Adenylatzyklase) zu beruhen, die zu einer verminderten Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) führt (STEUBER und KROKER, 2002).

Nachteilig sind die hohen Kosten der Behandlung und die Toxizität für den Wirtsorganismus. Sie schränken den Einsatz dieser Präparate häufig ebenso ein, wie die mögliche Entwicklung von Resistenzen (GRAMICCIA et al., 1992; BANETH, 2002). Eine Erregerfreiheit kann mit pentavalenten Antimonverbindungen in der Regel ebenfalls nicht erzielt werden (SLAPPENDEL und TESKE, 1997; MORITZ et al., 1999).

2.5.1.1.1 N-Methylglucamin-Antimoniats (Glucantime[®], Rhône Mérieux)

Zur Therapie mit N-Methylglucamin-Antimoniats (Meglumin-Antimonat) sind verschiedene Dosierungsschemata in der Literatur angegeben. In der Regel erfolgt die Therapie über ein zeitlich definiertes Behandlungsintervall. So kann der Wirkstoff beispielsweise in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht (KGW)/Tag über einen Zeitraum von 3 bis 4 Wochen intravenös oder subkutan appliziert werden (BANETH, 2002). Ebenso ist es möglich, das Präparat in zwei Behandlungsperioden über jeweils 10 Tage mit einer 14 tägigen Behandlungspause zwischen den Intervallen einzusetzen. MORITZ et al. (1999) verabreichten hierzu in einer Studie in den ersten zwei Tagen jedes Intervalls Meglumin-Antimonat in einer Dosierung von 50 mg/kg KGW/Tag mit 0,9 % Natriumchloridlösung verdünnt intravenös. In

den folgenden 8 Tagen wurde die Dosierung auf 100 mg/kg KGW/Tag erhöht. Bereits nach etwa 10 Tagen konnte eine Besserung der Symptomatik verzeichnet werden. In einer Dosierung von 100 mg/kg KGW/Tag kann das Medikament auch über mehrere Therapieintervalle von je 2 bis 3 Wochen eingesetzt werden, wobei auch hier behandlungsfreie Zeiträume von 10 Tagen eingehalten werden sollten (DENEROLLE und BOURDOISEAU, 1999). Ist ein längere Applikationsdauer notwendig, eignet sich die subkutane Gabe von 200 mg/kg im Abstand von 48 Stunden über 30 bis 40 Tage (DENEROLLE und BOURDOISEAU, 1999). Da jedoch innerhalb der ersten 9 Stunden nach Applikation ca. 80 % des Wirkstoffes über die Niere ausgeschieden werden (VALLADARES et al., 1996), scheint eine Verabreichung des Präparates im Abstand von 12 Stunden empfehlenswert. VALLADARES et al. (1998) applizierten daher experimentell infizierten Hunden zwei mal täglich Meglumin-Antimonat in einer Dosierung von 75 mg/kg KGW subkutan, während Kontrolltiere ein mal täglich 100 mg/kg KGW des Wirkstoffes erhielten. Auf diese Weise konnten höhere Plasmakonzentrationen erzielt werden. Anzeichen von Toxizität waren bei dieser Dosierung nicht zu verzeichnen.

Eine von SLAPPENDEL et al. (1997) durchgeführte Studie zum Vergleich intravenöser und subkutaner Applikation ergab keinen Unterschied in Bezug auf die Dauer der klinischen Remission oder der mittleren Überlebenszeit. Andere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Bioverfügbarkeit nach subkutaner Injektion im Vergleich zu anderen Applikationsarten am höchsten ist (VALLADARES et al., 1996). Diese wird nach Ergebnissen von TASSI et al. (1994) mit 100 % angegeben. Zudem konnte nach subkutaner Verabreichung eine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit und eine Verminderung der Nebenwirkungen festgestellt werden. Da nach oraler Verabreichung keine Resorption des Wirkstoffes erfolgt, ist diese Applikationsform nicht zur Therapie geeignet (NOLI, 1999).

In Hinsicht auf mögliche Nebenwirkungen muß vor allen Dingen die Nephro- und Hepatotoxizität des Präparates bedacht werden. Insbesondere bei Patienten, die im Rahmen der Erkrankung bereits Schäden an Niere oder Leber aufweisen, führt eine verzögerte renale Ausscheidung zur weiteren Beeinträchtigung dieser Organe (STEUBER und KROKER, 2002). Ferner wird häufig eine Erhöhung der Pankreaswerte beobachtet (KRAFT und BAUER, 1994). Diese ist auf das Vorliegen einer ödematösen Pankreatitis zurückzuführen (KRAFT und BAUER, 1994; MORITZ et al., 1999). Regelmäßige Kontrollen der Pankreasparameter innerhalb des Therapieintervalls werden daher angeraten. Gegebenfalls

sollte die Therapie bis zur Normalisierung der Werte unterbrochen werden (KRAFT und BAUER, 1994; STEUBER und KROKER, 2002). In einer Studie von MORITZ et al. (1999) konnten bei Patienten unter Verabreichung von Glucantime® neben einer Erhöhung der Pankreaswerte auch Nebenwirkungen in Form von Vomit, Diarrhoe und Inappetenz bzw. Anorexie sowie Lethargie beobachtet werden. Bei einigen Patienten war eine Leukopenie zu verzeichnen. Schmerzhaft Reaktionen und Schwellungen am Applikationsort, welche insbesondere nach intramuskulärer Verabreichung auftreten, stellen weitere Nebenwirkungen dar. Jedoch gehen sie nur selten mit Lahmheit oder der Bildung von Abszessen einher (STEUBER und KROKER, 2002).

Die Nachteile in der Therapie mit Meglumin-Antimonat liegen neben den oft zu beobachtenden Nebenwirkungen und den hohen Behandlungskosten in einer häufig zu beobachtenden Resistenzentwicklung. GRAMMICIA et al. (1992) beobachteten nach Einsatz des Medikamentes eine um bis zu 41fach gesteigerte Resistenz des Erregers. Insbesondere durch Verwendung in subtherapeutischen Dosen, Behandlung der Tiere in zu kurzen Intervallen oder aber nach der Durchführung zahlreicher Therapiezyklen kann die Wirksamkeit des Medikamentes abnehmen. Häufige Rückfälle können die Folge sein (LAMOTHE, 1999). In der Veterinärmedizin werden auf Grund der Resistenzentwicklung bereits oft verlängerte Therapiezyklen mit häufigeren Applikationen des Medikamentes angewendet (LAMOTHE, 1999).

Zu bedenken sind im Zusammenhang mit der Entwicklung von Resistenzen durch die Behandlung der kaninen Leishmaniose vor allem die hierdurch bedingten Einschränkungen der Therapiemöglichkeiten in der Humanmedizin auf Grund resistenter Erregerstämme (BANETH, 2002). Die Wahl der Dosierung und die Dauer der Behandlung müssen daher sorgfältig vom behandelnden Tierarzt überdacht werden.

In vielen Fällen wird eine Kombinationstherapie mit dem Hypoxanthinanalogue Allopurinol bevorzugt. FERRER (1997) befürwortet beispielsweise eine Gabe von Meglumin-Antimonat mit einer Dosierung von 75 mg/kg KGW/Tag subkutan über 20 bis 30 Tage. Sollte bis zu diesem Zeitpunkt keine Besserung der klinischen Symptomatik eingetreten sein, kann das Präparat über weitere 20 Tage verabreicht werden. Über den selben Zeitraum kann Allopurinol in einer Dosierung von 20 bis 30 mg/kg KGW/Tag verabreicht werden. Die Gabe von Allopurinol kann nach Abschluß der Behandlung bei Bedarf beibehalten werden. Anhand einer Studie von DENEROLLE et al. (1999) an insgesamt 96 Hunden konnten signifikante

Unterschiede in den Ergebnissen einer Behandlung mit Meglumin-Antimonat, Allopurinol bzw. einer Kombinationstherapie mit beiden Präparaten verzeichnet werden. Die gleichzeitige Behandlung mit Meglumin-Antimonat und Allopurinol führte zu einer deutlicheren Besserung klinischer Symptome als Monotherapien mit den jeweiligen Wirkstoffen. In Hinblick auf eine parasitologische Heilung konnten in diesem Zusammenhang jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

2.5.1.1.2 Natrium-Stiboglukonat (Pentostam[®], Wellcome)

Natrium-Stiboglukonat (Na-Stiboglukonat) kann in einer Dosierung von 20 bis 30 mg/kg KGW/Tag intravenös über eine Behandlungsperiode von 10 bis 14 Tagen verabreicht werden. Nach einer behandlungsfreien Zeit von 10 Tagen wird ein zweiter Therapiezyklus mit der selben Dosierung angeraten (STEUBER und KROKER, 2002). Bei intravenöser Gabe empfiehlt sich die Applikation des Wirkstoffes in Form von Infusionen mittels 0,9 % Natriumchloridlösung, da bei Bolusinjektionen ein plötzlicher Zusammenbruch der Herzkreislauffunktion beobachtet werden kann (STEUBER und KROKER, 2002). Neben der intravenösen Applikation sind subkutane Injektionen über einen Zeitraum von 10 bis 30 Tagen möglich. Die Dosierung beträgt hierbei 10 bis 50 mg/kg KGW/Tag (NOLI, 1999).

Ebenso wie im Rahmen der Behandlung mit Glucamin-Antimonat können Erhöhungen der Pankreaswerte auftreten. Auf Grund der Nephro- und Hepatotoxizität von Na-Stibogluconat ist auch hier bei Patienten mit eingeschränkter Funktion dieser Organe gegebenenfalls von einer Therapie abzusehen (STEUBER und KROKER, 2002).

CHUNGE et al. (1985) behandelten Hunde, die auf eine alleinige Therapie mit Na-Stibogluconat nicht ansprachen, zusätzlich mit Allopurinol und erzielten auf diese Weise einen klinischen Rückgang der Symptome. Milzaspirate erbrachten nach 19 Tagen ein negatives parasitologisches Ergebnis. Rückfälle konnten bei keinem Tier innerhalb der folgenden 12 Monate beobachtet werden.

2.5.2 Second line drugs

2.5.2.1 Allopurinol (z.B. Zyloric[®], Wellcome)

Der aus der Humanmedizin zur Behandlung der Gicht stammende Wirkstoff Allopurinol ist ein Hypoxanthinanalogen, welches die Vermehrung der Parasiten zu hemmen vermag (STEUBER und KROKER, 2002). Die leishmaniostatistische Wirkungsweise des Allopurinols beruht auf einer Hemmung der Xanthinoxidase. Dieses Enzym wandelt Hypoxanthin in Xanthin um, welches im Anschluß Einsatz in die Purinsynthese findet. Eine Hemmung dieses Enzyms geht in Folge dessen mit einer verminderten Purinsynthese einher. Diese Störung des Proteinstoffwechsels, welche eine Vermehrung der Parasiten unterbindet, wird ferner durch eine Hemmung der Pyrimidinsynthese mittels Allopurinol intensiviert. Im Gegensatz zu den Parasiten sind die Wirtsorganismen in der Lage, Purine eigenständig zu synthetisieren. Aus diesem Grund ist die Toxizität für den Wirt äußerst gering.

Die in der Literatur befindlichen Angaben zur Dosierung sind zahlreich und variieren deutlich. So wurde Allopurinol in einer Studie von KOUTINAS et al. (2001) in einer Dosierung von 10 mg/kg KGW zwei mal täglich per os über einen Zeitraum von 4 Monaten verabreicht. CAVALIERO et al. (1999) setzten dagegen zur Langzeitbehandlung von leishmaniosekranken Hunden 10 mg/kg KGW ein mal täglich mit gutem Erfolg zur Behandlung ein. Die Applikation einer höheren Dosierung über einen längeren Zeitraum ist auch möglich. DENEROLLE et al. (1999) behandelten natürlich infizierte Hunde zwei mal täglich über einen Zeitraum von bis zu 20 Monaten in einer Dosierung von 15 mg/kg KGW. Ebenfalls gute Ergebnisse erzielte eine Untersuchung, in der an Anlehnung an die Humanmedizin eine Dosis von 5 mg/kg KGW drei mal täglich über einen Zeitraum von 1-10 Monaten verabreicht wurde (VERCAMMEN et al., 1995).

Da in einigen Fällen die Wirksamkeit von Allopurinol bei alleiniger Verabreichung unbefriedigend sein kann, besteht die Möglichkeit zur Kombinationstherapie mit Meglumin-Antimonat (siehe auch Kapitel 2.5.1.1.1) (LAMOTHE, 1999; MORITZ et al., 1999; BANETH, 2002; STEUBER and KROKER, 2002). GINEL et al. (1998) setzten nach Initialbehandlung mit Meglumin-Antimonat (100 mg/kg KGW/Tag) und Allopurinol (30 mg/kg KGW/Tag) zur Langzeitbehandlung den Wirkstoff über mehrere Monate in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW/Tag über eine Woche innerhalb eines Monats mit gutem

klinischen Erfolg ein. Ein Teil der Tiere erhielt als Kontrollgruppe nach der Initialbehandlung kein Allopurinol. In dieser Gruppe wurden Rezidive bei 86 % der Tiere innerhalb eines Zeitraumes von 14 Monaten beobachtet, während die mit Allopurinol weiterbehandelten Hunde keine Rezidive zeigten. Folglich scheint der Wirkstoff eine Verzögerung von Rezidiven bewirken zu können (GINEL et al., 1998).

Allopurinol wird – mit einer Bioverfügbarkeit von ca. 70 % - nach Applikation umgehend resorbiert, so daß maximale Plasmaspiegel des Präparates bereits nach 40 Minuten erreicht werden. Als Abbauprodukt wird Oxypurinol vor allem über die Nieren ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt hierbei 2 Stunden (STEUBER und KROKER, 2002).

Neben der geringen Toxizität, der Möglichkeit zur peroralen Applikation und dem günstigen Medikamentenkosten liegt der Vorteil dieses Präparates insbesondere in der guten klinischen Wirksamkeit, die in zahlreichen Studien und Fallbeispielen nachgewiesen werden konnte (VERCAMMEN et al., 1995; LESTER und KENYON, 1996; GOTHE et al., 1997; CAVALIERO et al., 1999; MORITZ et al., 1999). MARTINEZ et al. (1992) setzten auch in der Humanmedizin Allopurinol mit gutem Erfolg zur Therapie der kutanen Leishmaniose ein. In der Regel kann nach Verabreichung des Präparates ein Rückgang des Antikörpertiters beobachtet werden. Dieser bleibt jedoch häufig positiv und steigt nach Absetzen der Therapie erneut an (VERCAMMEN et al., 1995; VERCAMMEN und DEDEKEN, 1996). Untersuchungen von KOUTINAS et al. (2001) erbrachten den Nachweis einer signifikant reduzierten Parasitendichte in Knochenmarks- und Lymphknotenaspiraten bei Tieren nach Allopurinoltherapie bei jedoch weiterhin positiver Knochenmarks-PCR (KOUTINAS et al., 2001). In einigen Fällen scheinen allerdings durch eine Langzeitapplikation von Allopurinol negative PCR-Ergebnisse erzielt werden zu können (MORITZ et al., 1999).

Nebenwirkungen werden unter Therapie mit Allopurinol nur selten beobachtet (STEUBER und KROKER, 2002). Neben Vomitus und Diarrhoe treten in Einzelfällen Urinkongmente in Form von Xanthinsteinen auf (LING et al., 1991). Resistenzentwicklungen unter der Behandlung mit diesem Wirkstoff sind nicht bekannt. GINEL et al. (1998) beobachteten diesbezüglich leishmaniosekrankte Hunde über einen Zeitraum von 3 Jahren ohne eine Einschränkung der Wirksamkeit feststellen zu können.

2.5.2.2 Amphotericin B

Die Wirkungsweise des von *Streptomyces nodosus* produzierten Polyenantibiotikums beruht auf dem strukturellen Aufbau des Moleküls. Neben einem lipophilen Ringsystem mit zahlreichen Doppelbindungen liegen auch hydrophile Hydroxylgruppen vor (STEUBER und KROKER, 2002). Auf Grund dieser amphoteren Eigenschaften lagert sich Amphotericin B vorzugsweise an Sterolen (v.a. Ergosterol) in der Zellmembran an und verändert auf diese Weise deren Permeabilität (LAMOTHE, 1999; STEUBER und KROKER, 2002). Die Erreger werden abgetötet, wenn Kationen und Anionen aus der Zelle austreten (LAMOTHE, 1999; BANETH, 2002). Neben einer guten Wirksamkeit gegen viele Protozoen besitzt Amphotericin B vor allem eine ausgeprägte antimykotische Wirkung, während die Wirksamkeit gegenüber Bakterien deutlich eingeschränkt ist. Aufgrund des geringen Gehaltes von Ergosterol in den Zellwänden von Säugetieren, ist die Toxizität für den Wirtsorganismus relativ gering (LAMOTHE, 1999; BANETH, 2002).

Amphotericin B wird überwiegend intravenös in Form von Infusionen angewendet. NOXON (1989) verabreichte den Wirkstoff in einer Dosis von 0,5 mg/kg KGW drei mal wöchentlich bis zu einer Gesamtdosis von 9 - 12 mg/kg KGW. Das Präparat wurde in 5%iger Dextrose-Lösung verdünnt und über einen Zeitraum von 5 Minuten appliziert. Eine Bolusgabe des Präparates ist ebenfalls möglich. LAMOTHE (1997) behandelte 30 leishmaniosekrankte Hunde mit gutem klinischen Erfolg zwei bis drei mal wöchentlich mit einer Dosis von 0,5 bis 0,8 mg/kg KGW, bis eine kummulative Dosis von 8 bis 15 mg/kg KGW erreicht wurde. Der Wirkstoff wurde innerhalb von 15 - 45 Sekunden intravenös verabreicht. Neben intravenöser Gabe besteht auch die Möglichkeit zur subkutanen Injektion. Hierzu wird der Wirkstoff mit einer Gesamtdosis von 8 bis 26 mg/kg KGW in physiologischer Kochsalzlösung oder 5%iger Dextroslösung verdünnt. Im Abstand von 48 Stunden erfolgt die Applikation von 0,15 bis 0,5 mg/kg KGW bis zum Erhalt der Gesamtdosis (NOLI, 1999). Zur Behandlung von Hunden mit Cryptokokkose verdünnte MALIK (1996) den Wirkstoff mit einer Gesamtdosis von 8 - 26 mg/kg in 500 ml einer 0,45%igen NaCl-Lösung mit 2,5%iger Dextrose. Die Gabe erfolgte zwei bis drei mal wöchentlich subkutan bis zum Erhalt der Gesamtdosis (LAMOTHE, 1999). Bei oraler Verabreichung ist die Resorption deutlich eingeschränkt, weshalb man auf diese Applikationsform verzichtet.

Die Ausscheidung des Wirkstoffes erfolgt zum größten Teil über die Faeces während ein geringerer Anteil über die Nieren ausgeschieden wird (STEUBER und KROKER, 2002).

Amphotericin B weist jedoch eine deutliche, dosisabhängige Nephrotoxizität auf. Aufgrund seiner vasokonstriktorischen Eigenschaft an den Nierengefäßen wird in diesem Zusammenhang die glomeruläre Filtrationsrate gesenkt. Daher sollten die Nierenwerte über den Behandlungszeitraum überwacht und die Therapie unterbrochen werden, wenn der Serum-Kreatinin-Level 220 $\mu\text{mol/l}$ überschreitet (LAMOTHE, 1999). Weitere zu beobachtende Nebenwirkungen sind Erbrechen und Fieber. Anaphylaktische Reaktionen sowie Schädigung der Leber und Arrhythmien sind ebenso wie hämolytische Anämien zu verzeichnen (STEUBER und KROKER, 2002). Eine Verminderung der Toxizität ist bei Verabreichung des Wirkstoffes in einer liposomalen Formulierung zu erzielen (OLIVA et al., 1995; LAMOTHE, 1999; BANETH, 2002). OLIVA et al. (1995) setzten eine solche Formulierung (AmBisome[®]) bei Hunden mit einer Dosierung von 3 bis 3,3 mg/kg KGW ein. Das Präparat zeigte nach Verabreichung von 3 bis 5 Injektionen neben einer guten klinischen Wirksamkeit eine geringere Nephrotoxizität. Weniger als 1 % des Wirkstoffes scheinen hierbei über die Niere ausgeschieden zu werden. Lymphknotenpunktate blieben nach Therapie weiterhin parasitologisch positiv. Rezidive waren nach einem Zeitraum von 4-6 Monaten zu verzeichnen.

Untersuchungen an Amphotericin B resistenten Leishmanienstämmen ergaben, daß diese Erreger neben einem erhöhten Amphotericin-Ausstrom aus der Zelle eine verminderte Wirkstoffaufnahme in die Zelle aufweisen. In diesem Zusammenhang konnte in den Zellmembranen der resistenten Parasiten ein erhöhter Anteil eines Ergosterolvorläufers bei Verminderung des Ergosterolanteils nachgewiesen werden (MBONGO et al., 1998). Über das Risiko einer Resistenzentwicklung durch den Einsatz von Amphotericin B ist bisher nichts bekannt (LAMOTHE, 1999; BANETH, 2002). DURAND et al. (1998) isolierten in Fällen von humaner Leishmaniose, bei denen die Patienten nicht auf eine Therapie ansprachen, Erreger vor und nach der Therapie. Eine Erhöhung der Resistenz nach Therapie war nicht zu verzeichnen.

2.5.2.3 Azole

Zu diesen oral zu verabreichenden Wirkstoffen zählen neben den Imidazolen Ketokonazol und Mikonazol auch die Triazole Flukonazol und Itrakonazol (LAMOTHE, 1999). Insbesondere der Wirkstoff Ketokonazol findet Einsatz bei leishmaniosekranken Hunden, die eine Resistenz gegenüber den pentavalenten Antimonverbindungen aufweisen (STEUBER und KROKER, 2002). Ketokonazol hemmt die Synthese von Ergosterol und in diesem

Rahmen den Aufbau einer intakten Zellmembran (STEUBER and KROKER, 2002). Fehlerhafte Membranfunktionen ziehen im Anschluß den Tod des Erregers nach sich.

In einer Dosierung von 7 mg/kg KGW eignet sich das Präparat zur Langzeittherapie über 40 bis 90 Tage (STEUBER and KROKER, 2002).

Neben Inappetenz und Alopezie wurde Pruritus als Nebenwirkung beobachtet. Bereits geringe Dosen von Ketokonazol vermögen die Serumkonzentration von Testosteron zu senken. Hohe Dosen dieses Wirkstoffes führen zu einer Verminderung der Kortisolproduktion durch Beeinflussung der Nebennierenrinde (FELDMAN, 2000). Da Ketokonazol teratogen wirkt, sollte es bei trächtigen Tieren nicht eingesetzt werden (STEUBER and KROKER, 2002). Als Kontraindikation gelten außerdem Nierenfunktionsstörungen (STEUBER and KROKER, 2002).

2.5.2.4 Pentamidinisethionat

Das aromatische Diamidin findet seit 1946 Einsatz in der Behandlung von Trypanosomen, Babesien und Leishmanien (LAMOTHE, 1999). Jedoch wird Pentamidinisethionat in der Regel nur bei Vorliegen von Resistenzen gegenüber pentavalenten Antimonaten zur Therapie der Leishmaniose verabreicht. Der Wirkungsmechanismus scheint auf einer Enzymblockade im Stoffwechsel der biogenen Amine zu beruhen. Die Proliferation und Differenzierung von Zellen wird auf diese Weise nachhaltig gestört und das Wachstum der Parasiten gehemmt (STEUBER and KROKER, 2002).

Da die intramuskuläre Injektion häufig zu schmerzhaften Prozessen im Rahmen von Muskelnekrosen und Abszessbildung führt, sollte das Präparat intravenös verabreicht werden (LAMOTHE, 1999; STEUBER und KROKER, 2002). Die Applikation ist langsam durchzuführen, da bei zu schneller Gabe neben Tachykardien und Zyanose auch Bewußtseinstörungen eintreten können (STEUBER und KROKER, 2002). STEUBER (2002) empfiehlt daher die Verdünnung des Wirkstoffes mit mindestens 500 ml Infusionslösung und die Verabreichung der Infusion über einen Zeitraum von 3 Stunden. Die Dosis kann im Verlauf des Therapieintervalls von etwa 16 Infusionen im Abstand von jeweils 2 bis 3 Tagen langsam erhöht werden. Während die Dosierung der ersten 6 Infusionen 2 mg/kg KGW betragen sollte, kann sie bei der 7. bis 12. Infusion auf 3 mg/kg KGW und im Anschluß auf 4 mg/kg KGW erhöht werden. Hunde mit einem Gewicht über 30 kg sollten

jedoch maximal mit 3 mg/kg KGW dosiert werden (STEUBER und KROKER, 2002). LAMOTHE schlägt dagegen die Verabreichung des Wirkstoffes mittels intraperitonealen Injektionen vor. Hierbei können jeweils 4 mg/kg im Abstand von 48 Stunden appliziert werden, nachdem der Wirkstoff zu einer 10%igen Lösung mit isotonischer Dextroselösung verdünnt wurde. Insgesamt sollten mindestens 15 Injektionen erfolgen.

Da bei den Patienten unter Therapie eine Verschlechterung der Nierenfunktion eintreten kann, sollte das Präparat bei Patienten mit einer bereits bestehenden Nierenfunktionsstörung nicht eingesetzt werden (STEUBER und KROKER, 2002). Vomitus, Tachykardien und Hypotension können bei einigen Patienten beobachtet werden (BANETH, 2002; STEUBER und KROKER, 2002).

RHALEM et al. (1999) behandelten 8 mit *L. infantum* infizierte Hunde mit Pentamidin in einer Dosierung von 4 mg/kg KGW intramuskulär über 2 Behandlungsintervalle. Jedes Behandlungsintervall dauerte 3 Wochen, in denen die Hunde jeweils 8 Injektionen im Abstand von ca. 3 Tagen erhielten. Die Tiere zeigten neben einer klinischen Besserung auch einen Rückgang des Antikörpertiters nach Therapie. Zu diesem Zeitpunkt gelang außerdem der Nachweis der Initiation einer zellulären Immunantwort.

2.5.2.5 Aminosidin

Das Aminoglykosid-Antibiotikum wird von *Streptomyces rimosus* produziert und auch als Paromomycin bezeichnet. Es führt über eine Beeinflussung der Ribosomen zur Bildung irregulärer Proteine und beeinträchtigt auf diese Weise die Vermehrung der Parasiten (STEUBER und KROKER, 2002).

Da nach oraler Verabreichung keine Resorption des Wirkstoffes stattfindet, muß die Applikation intravenös, intramuskulär oder subkutan durchgeführt werden. Dies kann in einer Dosierung von 5 bis 10 mg/kg KGW im Abstand von 12 Stunden und über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen erfolgen (NOLI, 1999). Bei Ausbleiben der Besserung kann eine Verdopplung der Dosis in Erwägung gezogen werden (STEUBER und KROKER, 2002).

Da Aminosidin neben einer Ototoxizität auch eine Nephrotoxizität besitzt, ist die Beobachtung der Nierenparameter über den Behandlungszeitraum von Bedeutung. Die Therapie sollte bei Anstieg des Serum-Kreatinins oder bei Einsetzen einer Proteinurie nicht

fortgesetzt werden. Liegt bereits vor Therapie eine Niereninsuffizienz oder eine Störung des VIII. Gehirnnervs vor, so ist von einer Behandlung mit Aminosidin abzusehen (STEUBER und KROKER, 2002). POLI et al. (1997) behandelten 12 leishmaniosekranke Hunde über 4 Wochen mit Aminosidin subkutan in einer Dosierung von 10 mg/kg KGW und verzeichneten bei einem Tier das Auftreten einer Taubheit. 11 Tiere zeigten neben einer klinischen Besserung auch einen Rückgang des Antikörpertiters und eine Verminderung zirkulierender Immunkomplexe. Eine parasitologische Heilung war jedoch nicht zu erzielen.

Eine Kombinationstherapie mit anderen Präparaten scheint möglich zu sein. SCOTT et al. (1992) behandelten 11 leishmaniosekranke Tiere mit Aminosidin als Monotherapie bzw. in Kombination mit anderen Therapeutika. Neun Patienten zeigten neben einer klinischen Besserung auch parasitologisch negative Ergebnisse. In einer Studie von OLIVA et al. (1998) wurden natürlich infizierte Hunde mit einer Monotherapie Aminosidin bzw. Meglumin-Antimonat oder mit einer Kombinationstherapie mit beiden Präparaten behandelt. Patienten, die beide Wirkstoffe erhielten, zeigten neben einer besseren klinischen Wirksamkeit auch die deutlichste Reduktion der Parasitendichte in Lymphknoten und Knochenmark. Zur Behandlung der humanen viszerale Leishmaniose setzten CHUNGE et al. (1990) neben Aminosidin Natrium-Stibogluconat ein. Eine klinische Heilung konnte sowohl bei Patienten mit einer Monotherapie der betreffenden Präparate als auch mit einer Kombinationstherapie erreicht werden. Diejenigen Patienten, die beide Wirkstoffe erhielten, erbrachten häufiger ein negatives parasitologisches Ergebnis in Milzaspiraten. Bei Kombination von Aminosidin mit Antimonaten sollte bedacht werden, daß Aminosidin die Ausscheidung der Antimonate verzögert (STEUBER und KROKER, 2002). Dieser zum einen therapeutisch interessante Ansatz ist auf Grund der deutlicher Nephrotoxizität beider Präparate zu überdenken und muß zunächst in weiterführenden Studien verifiziert werden.

2.5.3 Prophylaktische Maßnahmen

Die Entwicklung effektiver prophylaktischer Maßnahmen verfolgt zwei Ziele: Zum einen soll eine Infektion und die damit einhergehende Erkrankung eines Individuums verhindert werden. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da die kanine Leishmaniose prinzipiell als unheilbare Erkrankung eingestuft werden muß. Zum anderen soll die Vermeidung von Infektionen innerhalb einer Hundepopulation, die ein großes Erregerreservoir darstellt, vor allem auch die Infektionsrate der Bevölkerung in den endemischen Gebieten vermindern.

Untersuchungen von DIETZE et al. (1997) ergaben, daß die Erkennung und anschließende Ausmerzung seropositiver Tiere nicht zu einer verringerten Seroprävalenz beim Menschen in den betroffenen Gebieten geführt hat. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von DYE (1996), welcher mittels mathematischer Modelle die Effektivität verschiedener Methoden zur Kontrolle der Leishmaniose miteinander verglich. Weder die Euthanasie noch die Behandlung seropositiver Tiere kann die Erkrankungshäufigkeit in einer Gesamtpopulation nachhaltig reduzieren. DYE (1996) stellte in seinen Berechnungen fest, daß der konsequente Einsatz von Insektiziden die effektivste Kontrollmethode darzustellen scheint. Eine Vektorkontrolle durch Sprühen von z.B. Pyrethroiden in der häuslichen Umgebung ist jedoch laut WHO aufgrund logistischer Probleme und der hohen Kosten in den meisten endemischen Gebieten nicht dauerhaft durchführbar. Eine kontinuierliche Behandlung streunender Hunde mit Insektiziden kann ebenfalls nicht sicher gewährleistet werden. Da Impfungen auf einfache und kostengünstige Weise Infektionen in der Hundepopulation dauerhaft verhindern könnten, sollten sie als „Methode der Wahl“ angesehen werden (DYE, 1996). Die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes ist somit Ziel weltweiter Forschung.

Untersuchungen ergaben, daß Hunde innerhalb einer Stunde von bis zu 100 Schmetterlingsmücken gestochen werden können. Da ca. 1 % der Schmetterlingsmücken in endemischen Gebieten mit *L. infantum* infiziert sind, muß mit einem Stich einer infizierten Sandmücke pro Stunde gerechnet werden (GRADONI, 2002). Diese Zahlen unterstreichen die Notwendigkeit effektiver Maßnahmen zur Verhinderung von Infektionen.

2.5.3.1 Allgemeine Prophylaxemaßnahmen

Den sichersten Schutz vor einer Infektion bietet die Vermeidung eines Aufenthaltes in endemischen Gebieten. Möchte der Besitzer nicht auf die Mitnahme des Tieres in betroffene Länder verzichten, kann eine Reduktion der Infektionsgefahr durch eine verminderte Exposition gegenüber Schmetterlingsmücken erzielt werden. Hierzu sollten vor allen Dingen Aufenthalte im Freien zu den Hauptaktivitätszeiten der Vektoren vermieden werden. Das Verbringen der Hunde in geschlossene oder mittels Insektennetzen geschützte Räume eine Stunde vor bis eine Stunde nach Sonnenuntergang verringert in diesem Zusammenhang das Infektionsrisiko (TABOADA und MERCHANT, 2000). Laut WHO ist mit einem gehäuften Auftreten von Schmetterlingsmücken vor allem in der Umgebung von organischem Material zu rechnen. So stellt beispielsweise feuchter Boden mit einem großen Anteil organischen

Materials natürliche Plätze zur Eiablage der Weibchen dar (KILLICK-KENDRICK und KILLICK-KENDRICK, 1999). Ebenso bieten alte Baumbestände, Unrat sowie verfallene, feuchte Häuser optimale Bedingungen zur Entwicklung der Vektoren.

Mittels Allopurinol in einer Dosierung von 20 mg/kg KGW/Tag über den Zeitraum des Aufenthaltes in endemischen Gebieten kann eine medikamentelle Prophylaxe versucht werden. Eine einmalige Injektion von Glucantime® in einer Dosierung von 50 mg/kg KGW soll einen 14 tägigen Schutz bieten.

Um die Manifestation einer Erkrankung zu vermeiden, werden Kontrollen des Antikörpertiters mittels IFAT 3 bis 4 Wochen nach Rückkehr aus endemischen Gebieten angeraten. Diese sollten bei negativem Ergebnis zur Sicherheit nach einigen Wochen wiederholt werden. Bei positiven Ergebnis sollte der Einsatz von Medikamenten auch bei bisher ausbleibender klinischer Symptomatik in Erwägung gezogen werden (GOTHE, 1991).

2.5.3.2 Insektizide

Durch den Einsatz von Repellentien kann zum Teil eine signifikante Reduktion der Befallsrate mit Schmetterlingsmücken beim Hund herbeigeführt werden. Hierzu stehen neben Sprays und Spot-on-Präparaten neuerdings vor allem Halsbänder, die mit einem entsprechenden Wirkstoff getränkt sind, zur Verfügung.

In Untersuchungen von REITHINGER et al. (2001) wurde die Wirksamkeit verschiedener Repellentien miteinander verglichen. Den besten Schutz scheinen mit Deltamethrin getränkte Halsbänder (Scalibor®) zu bieten. Hunde, die mit einem solchen Halsband versehen waren zeigten neben einer um 69 % reduzierten Befallsrate auch eine um 86 % reduzierte Überlebensrate der blutsaugenden Mückenweibchen. Darüber hinaus konnten Permethrin (z.B. Pulvex®-Lotion, Exspot®-Spot-on oder Exspot®-Halsbänder) und Fenthion (z.B. Pulfim®-Lotion, Tiguvon®) eine gute Schutzfunktion gegenüber dem Befall mit Schmetterlingsmücken nachgewiesen werden. Der Wirkstoff Diazon (z.B. Canovel®-Halsbänder) zeigte in dieser Untersuchung keine signifikante Wirkung gegenüber den Vektoren (REITHINGER et al., 2001).

Die gute Schutzwirkung der mit Deltamethrin getränkten Halsbändern konnte bisher in zahlreichen Studien bestätigt werden (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al.,

2001; DAVIES et al., 2001; MAROLI et al., 2001). In einer Studie von KILLICK-KENDRICK et al. (1997) wurde ein 96 %iger Schutz vor Stichen von Schmetterlingsmücken nachgewiesen, der über einen Zeitraum von 34 Wochen andauerte. Diese Zeitspanne entspricht in etwa der Dauer einer „Mückensaison“. In einer im Iran durchgeführten Untersuchung wurde die Seroprävalenz bei Kindern und Hunden vor und nach einer Mückensaison überprüft. In Gebieten, in denen die Hunde mit Deltamethrin getränkten Halsbändern (Scalibor®) versehen waren, konnte eine signifikante Reduktion der Seroprävalenz bei den Tieren festgestellt werden. Kinder dieser Gebiete zeigten im Vergleich zu Kontrollgebieten, in denen die Hunde nicht mit entsprechenden Halsbändern versehen waren, eine grenzwertige Reduktion der Seroprävalenz, so daß sich hier der Hinweis auf einen Zusammenhang mit den Prophylaxemaßnahmen beim Hund ergibt (DAVIES et al., 2001).

2.5.3.3 Impfungen

An die im Rahmen der Bekämpfung der Leishmaniose zu entwickelnden Impfstoffe werden hohe Anforderungen gestellt. Da asymptomatische Hunde ein nicht zu identifizierendes Erregerreservoir darstellen, darf sich das Ziel der Impfungen nicht auf eine Reduktion der klinischen Symptomatik nach Infektion beschränken. Stattdessen muß die Etablierung der Erreger im Wirtsorganismus grundsätzlich verhindert werden (JAFFE, 2003). Nur auf diese Weise vermag der Einsatz von Vakzinen bei Hunden auch die Inzidenz der humanen Leishmaniose zu senken (JAFFE, 2003). Potente Impfstoffe sollten in der Lage sein, eine effektive zelluläre Immunität im Rahmen einer nachhaltigen Th1-Antwort zu aktivieren. In diesem Zusammenhang scheint beim Hund auch die Aktivierung von zytotoxischen CD8+Zellen eine Rolle zu spielen (PINELLI, 1996). Erschwerend wirkt sich bei der Entwicklung von Impfstoffen die Fähigkeit der Erreger aus, Oberflächenstrukturen ihrer Membranen im Laufe der Zeit zu verändern (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). Bei der Einteilung von Vakzinen werden „Impfstoffe der ersten Generation“ und „Impfstoffe der zweiten Generation“ unterschieden.

Bei Impfstoffen der ersten Generation handelt es sich um Präparate, bei denen abgetötete bzw. inaktivierte Erreger Verwendung finden. Die problemlose Möglichkeit zur Anzucht von Leishmanien im zellfreien Medium vereinfacht die Herstellung solcher Impfstoffe und ermöglicht auf diese Weise eine kostengünstige Produktion solcher Präparate (SACKS et al., 2001). In Hinblick auf die Verwendung in der Humanmedizin erwies sich die Wirkung dieser Impfstoffe jedoch in vielen Fällen als eingeschränkt (SHARIFI et al., 1998; MOMENI et al.,

1999). DUBE et al. (1998) gelang in diesem Zusammenhang zwar die Initiation eines Infektionsschutzes mittels einer Totvakzine basierend auf *L. major* und BCG (Bacillus Calmette-Guerin) als Adjuvants bei einem Versuch mit Affen, jedoch konnten die Ergebnisse in einer nachfolgend in der Humanmedizin durchgeführte Studie nicht auf den Menschen übertragen werden (KHALIL et al., 2000). Ebenso führten Untersuchungen bei Hunden, die mittels *L. braziliensis* geimpft und im Anschluß mit *L. chagasi* infiziert wurden, nicht zum gewünschten Erfolg (MAYRINK et al., 1996).

Im Gegensatz zu den Impfstoffen der ersten Generation scheinen die Ergebnisse, die unter dem Einsatz von Impfstoffen der zweiten Generation erzielt werden, vielversprechender zu sein. Diese Impfantigene werden aus gentechnisch gewonnenem Erregermaterial hergestellt. Hierzu zählen unter anderem Eiweiße unterschiedlicher Herkunft, wie beispielsweise Oberflächenproteine der Erreger oder Proteine der Geißel. In diesem Zusammenhang wurden Untersuchungen mit dem Glykoprotein gp63, welches auf der Membranoberfläche von amastigoten und promastigoten Erregern lokalisiert ist, durchgeführt. Mäuse, die mittels apathogener Salmonellen, welche das Protein ebenfalls in großen Mengen exprimieren, geimpft wurden, zeigten einen guten Schutz vor Infektion mit Leishmanien und waren in der Lage, eine protektive Th1-Antwort zu entwickeln (GESSNER et al., 1994). Nicht alle Antigene sind jedoch zur Induktion einer Schutzfunktion geeignet. DUNAN et al. (1989) vakzinieren Hunde mittels dem von *L. infantum* stammenden Antigen LiF2. Im Anschluß wurde jedoch eine höhere Infektionsrate bei den immunisierten Tieren als bei den Kontrolltieren, welches nur das Adjuvants erhielten, festgestellt.

Neben der Verwendung von Proteinen ist eine Vakzinierung mittels DNA möglich. Zur Impfung wird in der Regel ein Plasmid verwendet, welches die Gensequenz eines bestimmten Proteins codiert aber keine Tendenz zur Integration in das Wirtsgenom zeigt. Das Plasmid kann über einen längeren Zeitraum im Wirtsorganismus persistieren und wird in dieser Zeit exprimiert (SACKS et al., 2001). DNA-Vakzine bieten auf diese Weise nicht nur die Möglichkeit zur kostengünstigen Produktion des Antigens in großen Mengen, sondern ermöglichen durch ihr Vorliegen in „Reinform“ auch eine effiziente Präsentation an das Immunsystem (JAFFE, 2003). Das in-vivo produzierte Protein ist in der Lage, eine langanhaltende spezifische Immunantwort hervorzurufen (COHEN et al., 1998; GURUNATHAN et al., 2000). Neben einer CD4+Zellantwort wird auch eine CD8+Zellantwort induziert (JAFFE, 2003). Insbesondere DNA-Sequenzen, die Cytosin-

Phosphat-Guanosin Dinukleotide in einem gewissen Basenkontext aufweisen, scheinen besonders geeignet zu sein, eine Th1-Antwort zu induzieren (SATO et al., 1996; ROMAN et al., 1997). XU et al. (1998) verabreichten Mäusen ein Plasmid, welches das Glykoprotein gp63 codiert. Gegenüber Kontrolltieren, die mit einem uncodierten Plasmid behandelt wurden, konnte eine signifikante Steigerung des Infektionsschutzes erzielt werden. Zellen der Lymphknoten und der Milz der vakzinierten Mäuse wiesen eine vermehrte Produktion von IL-2 und IFN- γ auf.

GURUNATHAN et al. (1998) führten Untersuchungen durch, in denen die Effektivität einer Impfung mittels eines Antigens im Vergleich zu einer Impfung mittels des entsprechenden Plasmids verglichen wurde. Hierbei wurde einem Teil der Tiere das sogenannte LACK-Antigen appliziert, während den übrigen Tieren das entsprechende Plasmid injiziert wurde. Tiere, welche mittels Plasmide vakziniert wurden, wiesen eine bessere Schutzfunktion gegenüber Infektion auf, als Tiere, die das entsprechende Antigen erhielten. Ähnliche Befunde erbrachte eine Studie von SJOLANDER et al. (1998). Unter Verwendung eines Plasmids bei Mäusen, welches das Oberflächenantigen-2 von *L. major* codiert, konnte die Induktion einer Th1-Antwort erzielt und ein Schutz vor einer nachfolgenden experimentellen Infektion vermittelt werden. Eine Vakzinierung mittels des Antigens induzierte neben einer Th1-Antwort ebenso eine Th2-Antwort. Eine Schutzfunktion bei nachfolgender Infektion war in diesem Fall nicht zu verzeichnen.

Die Möglichkeit zur simultanen Vakzinierung mittels unterschiedlicher Plasmide stellt einen weiteren Vorteil im Einsatz von DNA-Vakzinen dar. MENDEZ et al. (2001) erzielten bei Mäusen nach gleichzeitiger Verwendung verschiedener Plasmide eine gute Schutzfunktion gegenüber einer Infektion mit *L. major*. In diesem Zusammenhang konnte die Initiation sowohl einer CD4⁺- als auch einer CD8⁺-Zellantwort nachgewiesen werden.

Eine weitere Optimierung der Ergebnisse scheint eine Impfung zu erbringen, die sich am Ablauf einer natürlichen Infektion orientiert. Während in bisherigen Untersuchungen in der Regel eine große Anzahl von Erregern subkutan appliziert wurde, wurden nun – ähnlich wie durch den Stich einer Sandmücke bedingt - kleine Erregermengen intrakutan injiziert (SACKS et al., 2001). BELKAID et al. (2000) beobachteten, daß bei intradermalen Injektionen kleiner Erregermengen eine effektive Immunantwort unter Produktion von IFN- γ induziert wurde. Dies trat erst nach einer vier bis fünf Wochen dauernden Phase auf, in der

sich die Erreger ohne makroskopische oder histologische Veränderungen im Bereich der Inokulationsstelle vermehren konnten.

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Entwicklung einer effektiven Vakzine ist die immunmodulierende Eigenschaft von Mückenspeichel, welcher zahlreiche pharmakologisch aktive Substanzen beinhaltet (SACKS et al., 2001). KAMHAWI et al. (2000) beobachteten, daß Mäuse, die vor experimenteller Infektion von nicht infizierten Sandmücken gestochen wurden, eine deutliche Reaktion vom verzögerten Typ einschließlich einer hohen IFN- γ Produktion zeigten. Dies kann Grundlage für die Initiation einer Th1-Antwort sein. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde eine DNA-Vakzine eingesetzt, die auf einem Protein aus dem Mückenspeichel beruht und ein Molekulargewicht von 15 kD besitzt. Mit diesem als „SP15“ bezeichneten Eiweiß gelang die Immunisierung von Mäuse gegen eine Infektion mit *L. major*, bei der die Erreger gleichzeitig mit Homogenisat der Speicheldrüse von Mücken appliziert wurden (VALENZUELA et al., 2001).

2.6 Zukünftige Therapieansätze

Die zur Zeit auf dem Markt befindlichen Präparate zur Behandlung der kaninen Leishmaniose können keine Heilung im Sinne einer Erregerfreiheit im Knochenmark gewährleisten und verursachen neben hohen Kosten häufig nicht zu vernachlässigende Nebenwirkungen. Die Entwicklung neuer Therapieansätze ist daher bei dem als Erregerreservoir geltenden Hund unerlässlich (BANETH und SHAW, 2002). Auch in der Humanmedizin gestaltet sich die Behandlung der Leishmaniose mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapeutika oft schwierig. Laut WHO liegen bereits bei mehr als 50 % der Patienten Resistenzen gegenüber pentavalenten Antimonaten vor. Deutliche Nebenwirkungen wie Pankreatitiden oder Schädigungen des Herz-Kreislaufsystems sind bei Verwendung dieser Wirkstoffe häufig. Außerdem stellt die parenterale Applikationsform über einen Zeitraum von 28 Tagen insbesondere bei Epidemien einen nicht zu bewältigenden Aufwand für das medizinische Personal in diesen Gebieten dar (WHO, 2003). Ähnlich verhält es sich bei dem Gebrauch von Pentamidin. Schwerwiegende Nebenwirkungen minimieren die Einsatzmöglichkeiten des Wirkstoffes (WHO, 2003). Bei bis zu 10 % der Patienten kann Diabetes auftreten, der auch nach Behandlungsende manifest bleibt (WHO, 2003). Das hochwirksame Amphotericin B ruft – insbesondere in seiner besser verträglichen liposomalen Formulierung - solch hohe Behandlungskosten hervor, daß vor allem in Entwicklungsländern der Einsatz dieses Präparates theoretisch erscheint. Laut WHO können 95 % der Patienten aus Kostengründen

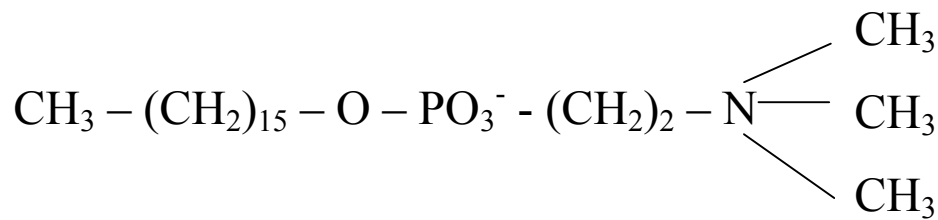
nicht mit diesem Wirkstoff behandelt werden. Ferner erschweren die parenterale Verabreichung über 15 bis 20 Tage und die nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen häufig die Einsatzmöglichkeiten dieses Präparates (WHO, 2003). Das Ziel der Forschung muß daher sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin die Entwicklung von effektiveren und besser verträglichen Präparaten sein. Neben einer kostengünstigen Produktion in großen Mengen sollte der Wirkstoff nur geringe Nebenwirkungen hervorrufen. Eine Applikation in Form von Tabletten würde neben einer einfachen Anwendungsmöglichkeit in der Regel den Vorteil einer Lagerungsmöglichkeit bei Raumtemperatur bieten.

Ein für die Humanmedizin zunächst als antineoplastisches Präparat (Miltefosin[®], Zentaris AG) entwickelter Wirkstoff wies in vitro eine Aktivität gegen Leishmanien auf (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). Nach weiterführenden Untersuchungen scheinen – bei einer sehr guten Wirksamkeit des Präparates - zahlreiche der zuvor genannten Bedingungen umgesetzt werden zu können.

2.6.1 Hexadecylphosphocholin (Miltefosin[®], Zentaris AG)

2.6.1.1 Struktur und Wirkungsweise

Bei dem aus der Humanmedizin zur Behandlung von Hautmetastasen bei Brustkrebs stammenden Präparat Miltefosin[®] handelt es sich um ein synthetisches Phospholipid. Die genaue Bezeichnung des Wirkstoffes ist Hexadecylphosphocholin, dem Phosphorylcholinester von Hexadecanol (EIBL, 2000; MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). Die Struktur des Moleküls ist in Abbildung 3 dargestellt. Auf Grund der einfachen Molekülstruktur ist es kostengünstig und in großen Mengen produzierbar (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000).

Abbildung 3: Die molekulare Struktur von Hexadecylphosphocholin (Miltefosin[®])

Bereits 1987 wurde in Untersuchungen von CROFT et al. (1987) die Aktivität von Alkylphosphocholinen gegen *L. donovani* nachgewiesen. Amastigote reagierten sowohl in vitro als auch in vivo auf die Wirkstoffe. Dieser Effekt konnte auch nach Einsatz von Hexadecylphosphocholin beobachtet werden. Nach oraler Applikation des Präparates über 5 Tage in einer Dosierung von 10 bis 20 mg/kg KGW zeigten Knochenmark und Milz von experimentell infizierten Mäusen einen deutlichen Rückgang der Erregerdichte (KUHLENCORD et al., 1992). In einer Langzeitbehandlung über 4 Wochen konnte in diesem Zusammenhang eine um mehr als 600fach gesteigerte Wirksamkeit im Vergleich mit Natrium-Stibogluconat nachgewiesen werden (KUHLENCORD et al., 1992). Weitere Tierversuche bestätigen die gute Wirksamkeit des Präparates (LE FICHOUX et al., 1998; MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000).

Der Wirkungsmechanismus dieser Substanz scheint noch nicht vollständig geklärt zu sein. Untersuchungen von EIBL und UNGER (1990) weisen im Zusammenhang mit der antineoplastischen Wirkung von Alkylphosphocholinen auf eine Beeinflussung der Zellmembran hin. Miltefosin[®] inhibiert in dosisabhängiger Weise Enzyme der Umformungsprozesse von Ether-Lipiden (Alkyl-spezifische-Acyl-CoA Acyltransferasen), die in großen Mengen in den Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche der Parasiten vertreten sind. Diese Eigenschaft könnte die leishmanizide Wirkung des Präparates erklären (LUX et al., 2000).

Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit der Wirkungsweise eines Präparates ist die Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten. Es wurde beobachtet, daß Makrophagen und T-Zellen unter dem Einfluß von Hexadecylphosphocholin vermehrt Zytokine (z.B. IFN- γ) sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite sezernieren. Für Patienten, die eine reduzierte Abwehrfunktion im Rahmen ihrer T-Zellpopulationen aufweisen, muß jedoch eine

gute Wirksamkeit des Präparates gewährleistet bleiben. Um dies unter experimentellen Bedingungen zu prüfen, erhielten Mäuse mit einem T-Zelldefekt nach Infektion den Wirkstoff. Eine eingeschränkte Wirkung konnte hierbei nicht beobachtet werden (MURRAY und DELPH-ETIENNE, 2000).

Das Präparat weist nach oraler Applikation eine gute Bioverfügbarkeit auf (EIBL und UNGER, 1990). Der Wirkstoff akkumuliert nach oraler Aufnahme und Resorption in Organen, in denen mit einer erhöhten Erregerdichte zu rechnen ist (Leber, Milz) (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). Insbesondere Makrophagen scheinen sich mit dem Wirkstoff anzureichern (BANETH, 2002). In Tierversuchen konnte zudem eine lange Halbwertszeit des Wirkstoffes festgestellt werden. Diese wird im Experiment mit Mäusen mit 96 Stunden angegeben (BREISER et al., 1987; MURRAY, 2000).

Intravenöse und subkutane Injektionen führen zu schweren Nebenwirkungen in Form von Hämolyse bzw. hochgradigen Veränderungen des Gewebes im Bereich der Injektionsstelle (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000).

Das Präparat kann in einer Formulierung zur oralen Applikation bei Temperaturen zwischen 0 und 40 Grad Celsius über einen langen Zeitraum gelagert werden (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000).

2.6.1.2 Einsatz von Miltefosin® in der Humanmedizin

In zahlreichen in-vitro-Versuchen und Experimenten mit Mäusen konnte die Wirksamkeit von Hexadecylphosphocholin gegen Leishmanien nachgewiesen werden (KUHLENCORD et al., 1992; LE FICHOUX et al., 1998; LUX et al., 2000; MURRAY and DELPH-ETIENNE, 2000). In der Humanmedizin wurden erste Untersuchungen an insgesamt 26 an Krebs erkrankten Patienten durchgeführt, die den Wirkstoff in einer oralen Formulierung erhielten (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). In einem Dosierungsbereich von 50 - 200 mg konnten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet werden (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). 1995 trafen die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und das in die Produktion des Wirkstoffes eingebundene pharmazeutische Unternehmen (ASTA Medica/Zentaris) eine

Übereinkunft über eine gemeinsame Entwicklung des Medikamentes im Rahmen der Behandlung der viszeralen Leishmaniose (WHO, 2003).

Es erfolgten klinische Studien der Phase I und II in Indien, in denen zunächst dosisorientierende und pharmokokinetische Untersuchungen im Vordergrund standen (WHO, 2003). Patientengruppen von 30 bzw. 60 Erkrankten erhielten zunächst eine Dosierung von 50 bis 250 mg/Tag, bzw. 100 bis 200 mg/Tag. Heilungsraten von nahezu 100 % bei tolerierbaren Nebenwirkungen wurden insbesondere in einer Dosierung von 100-150 mg über 28 Tage erzielt. Diese Ergebnisse bestätigten sich in den folgenden Untersuchungen (SUNDAR et al., 1998; SUNDAR et al., 1999).

In den Jahren 1998 und 1999 wurden im Rahmen einer Phase-II-Studie insgesamt 120 Patienten mit einer Dosierung von 50, 100 oder 150 mg/Tag über einen Zeitraum von 4 oder 6 Wochen oral mit Miltefosin® behandelt (HERWALDT, 1999; JHA et al., 1999). Hierzu wurden HIV-negative Patienten mit einer mittelgradigen Schwere der Erkrankung (Fieber, Anorexie, Splenomegalie) und positivem Erregernachweis in Milzaspiraten ausgewählt. 41 % dieser Patienten sprachen nicht auf eine Behandlung mit Meglumin-Antimonat an. Bei allen Patienten erbrachte der Erregernachweis 2 Wochen nach Behandlungsende ein negatives Ergebnis. Nach 6 Monaten war eine Heilungsrate von 95 % feststellbar. 112 Patienten wiesen zu diesem Zeitpunkt weder eine klinische Symptomatik auf, noch lag ein positiver Erregernachweis vor (HERWALDT, 1999; JHA et al., 1999). Eine Heilungsrate von 97 % konnte bei Patienten festgestellt werden, die mit einer Dosierung von 100 mg/Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen behandelt wurden (HERWALDT, 1999).

Aufgrund dieser Befunde wurden in der im Anschluß durchgeführten klinischen Studie der Phase III den Patienten mit viszeraler Leishmaniose 2 x täglich 50 mg des Wirkstoffes oral verabreicht. Diese Untersuchungen umfassten fast 300 Patienten (HERWALDT, 1999). Hierbei wurde neben der klinischen Wirksamkeit des Präparates vor allen Dingen eine Vergleichsuntersuchung in Bezug auf die Wirksamkeit von Amphotericin B durchgeführt. Miltefosin® zeigte 6 Monate nach Therapieende eine Heilungsrate von 94 %. Die Heilungsrate von Amphotericin B betrug zu diesem Zeitpunkt 97 % (SUNDAR et al., 2002).

In der Phase IV der klinischen Prüfung werden nun 1200 Erkrankte in eine Analyse der Wirksamkeits- und Sicherheitsprüfung einbezogen, die eine Beobachtung der behandelten Patienten über einen Zeitraum von 6 Monaten einschließt. Da sich zuvor Hinweise auf eine

negative Beeinflussung der männlichen Fertilität ergaben, wird eine Beobachtung der männlichen Studienteilnehmer über einen Zeitraum von 1,5 Jahren angesetzt (WHO, 2003). Neben den Studien bei Erwachsenen wurden die entsprechenden Untersuchungen ebenfalls bei Kindern durchgeführt (HERWALDT, 1999; WHO, 2003). Auch hier konnten Heilungsraten von 94 % erzielt werden (BHATTACHARYA et al., 2004). Die Wirksamkeit des Präparates zur Behandlung der kutanen Leishmaniose wird darüber hinaus zur Zeit in Südamerika in der klinischen Prüfung Phase-III überprüft (WHO, 2003).

Die in allen Phasen der klinischen Prüfung beobachteten Nebenwirkungen stellen insbesondere gastrointestinale Symptome dar (SUNDAR et al., 1998; HERWALDT, 1999; JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 1999). Vomitus und Diarrhoe wurden bei bis zu 73 % der Patienten beobachtet (SUNDAR et al., 1998). Jedoch war die Symptomatik meist nur gering- bis mittelgradig ausgeprägt, so daß nur in Einzelfällen eine Unterbrechung der Therapie erfolgte. Bei bis zu 25 % der Patienten konnten transiente Erhöhungen der Aspartat-Aminotransferase (AST), des Kreatinins oder des Harnstoffs festgestellt werden (JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 1999). Auch hier erfolgte nur in Einzelfällen ein Therapieabbruch auf Grund erhöhter Leber- und Nierenwerte (JHA et al., 1999). Die bei Ratten unter Anwendung von Hexadecylphosphocholin auftretenden ophthalmologischen Veränderungen konnten beim Menschen nicht beobachtet werden (JHA et al., 1999). Da im Tierversuch ein teratogener Einfluß auf ungeborenes Leben nachgewiesen werden konnte, ist eine Behandlung mit Miltefosin während einer Schwangerschaft kontraindiziert (HERWALDT, 1999; WHO, 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen: Miltefosin[®] kann kostengünstig und in großen Mengen produziert werden. So schätzt Indien beispielsweise für die Behandlung von rund 70.000 Patienten pro Jahr Kosten von maximal 3,5 Mio US \$ ein. Die Lagerung des Medikamentes bedarf bei Temperaturen von bis zu 40 Grad Celsius keiner zusätzlichen Kühlung. Es stellt ein effektives, oral zu verabreichendes Präparat zur Behandlung der viszeralen Leishmaniose bei Erwachsenen und Kindern dar (WHO, 2003). Auch bei Patienten, bei denen eine Therapie mit Antimonpräparaten fehlschlug, zeigt dieser Wirkstoff eine gute Wirksamkeit (SUNDAR et al., 1998; WHO, 2003). Die bei der Behandlung auftretenden Nebenwirkungen sind tolerabel und transient. Kontraindikationen betreffen lediglich eine geringe Patientenzahl.

Miltefosin[®] erhielt 2002 den Orphan-Drug-Status der EU und kam 2003 als erstes oral wirksames Medikament zur Behandlung der Leishmaniose in Indien auf den Markt. Weitere Länder (u.a. Europa) haben die Zulassung des Medikaments ebenfalls beantragt.

2.6.1.3 Einsatz von Miltefosin[®] beim Hund

Obwohl Miltefosin[®] bereits in Einzelfällen mit Erfolg zur Behandlung der kaninen Leishmaniose eingesetzt wurde (GOERBLICH, 2000), eignet es sich auf Grund deutlicher Nebenwirkungen nicht zur Therapie bei Hunden (BANETH, 2002; BANETH und SHAW, 2002; DEPLAZES und METTLER, 2003). Zu den Nebenwirkungen zählt neben Inappetenz vor allem auch Vomitus (EIBL, persönliche Mitteilung).

2.6.2 Oleyl-Phosphocholin

2.6.2.1 Struktur

Bei diesem Wirkstoff handelt es sich um ein strukturell dem Hexadecylphosphocholins eng verwandten Alkylphosphocholin (BANETH, 2002). Oleyl-Phosphocholin liegt in einer liposomalen Formulierung vor und eignet sich zur subkutanen Injektion (EIBL, persönliche Mitteilung).

2.6.2.2 Einsatz von Oleyl-Phosphocholin in der Veterinärmedizin

Der Wirkstoff wird zur Zeit in Untersuchungen beim Hund eingesetzt (BANETH, 2002). Bisher wurden in der Literatur keinerlei Ergebnisse über den Einsatz in der Veterinärmedizin veröffentlicht.

3. Material und Methoden

Ziel und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit waren:

1. Prüfung der klinischen Wirksamkeit von Oleyl-Phosphocholin (Ol-PC) zur Behandlung der kaninen Leishmaniose
2. Prüfung der Wirksamkeit von Ol-PC hinsichtlich krankheitsbedingt veränderter labordiagnostischer Parameter
3. Kontrolle des Erregerstatus im Knochenmark nach Therapie im Hinblick auf eine Erregerfreiheit und in diesem Sinne auf eine Heilung
4. Erfassung und Dokumentation von möglichen Nebenwirkungen (klinisch und labordiagnostisch)

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verwendet:

Geräte

- Autoanalyser Cobas Mira Plus (ROCHE DIAGNOSTICA, Basel, Schweiz)
- Hämatologie System ADVIA 120 (BAYER DIAGNOSTICS, München)
- Resonanzthrombograph RTG-S 801 (FRESENIUS MEDIZINTECHNIK, Bad Homburg)
- Amelung-Coagulometer KC 4A (SIGMA-AMELUNG, Lemgo)
- Zentrifuge Hettich „Mikro 20“ (HETTICH, TUTTLINGEN)
- Zentrifuge Hettich „EBA 85“ (HETTICH, TUTTLINGEN)
- Zentrifuge „MiniSpin[®] plus“ (EPPENDORF, Hamburg)

- Refraktometer HRMT 18 TC (A. KRÜSS OPTRONIC, Hamburg)
- Peltier Thermal Cycler „PTC-200“ mit Block 30/30 (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
- Polaroid GelCam (POLAROID GmbH, Offenbach)
- Polaroid Lichtschutztubus „GH 20“ (POLAROID GmbH, Offenbach)
- UV-Transluminator „N-90 (MW)“ 312 nm (BENDA, Wiesloch)
- GeneQuant RNA/DNA Calculator (AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg)
- Elektrophoresekammer „ComPhor Midi L“ (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
- Spannungsgeber I, 400V, 250mA (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
- Pipette Precision 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl und 100 – 1000 ml (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
- 1-Kanalpipette Biohit 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
- Urinteststreifen Combur-9-Test, Artikelnummer 398 420 (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim)

Reagenzien:

- May-Grünwalds Eosin-Methylenblau-Lösung, modifiziert für die Mikroskopie, Artikelnummer 1.01424.0500 (MERCK, Darmstadt)
- Giemsa-Lösung, Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie, Artikelnummer 1.09204.0500 (MERCK, Darmstadt)

-
- Lidocainhydrochlorid, Xylocain[®] 2%, Artikelnummer 1138002 (ASTRA ZENECA GmbH, Wedel)
 - PBS-Phosphatpuffer-Konzentrat, Artikelnummer 3613 (BAG, Lich)
 - Dneasy Tissue Kit (50), Artikelnummer 69504 (QIAGEN, Hilden)
 - Ethanol, Rotipuran[®] $\geq 99,8$ % p.a., Artikelnummer 9065.3 (C.ROTH GmbH, Karlsruhe)
 - AmpliTaq Gold DNA Polymerase with Buffer II, Artikelnummer N8080241 (PERKIN ELMER, APPLIED BIOSYSTEMS GmbH, Weiterstadt)
 - GeneAmp dNTP Blend, 10 mM, Artikelnummer N8080260 (PERKIN ELMER, APPLIED BIOSYSTEMS GmbH, Weiterstadt)
 - GeneAmp 10x PCR Buffer II and MgCl₂ Solution, Artikelnummer N8080010 (PERKIN ELMER, APPLIED BIOSYSTEMS GmbH, Weiterstadt)
 - Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) 10 x konzentriert, pH 8,3, Artikelnummer 106177 (MERCK, Darmstadt)
 - Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser) für die Elektrophorese, Artikelnummer 1.11608.0010 (MERCK, Darmstadt)
 - BMA Seakem[®] LE Agarose, Artikelnummer 840004 (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
 - Blue/Orange 6X Loading Dye, Artikelnummer G1881 (PROMEGA, Mannheim)
 - Nukleasefreies Wasser, Artikelnummer P1193 (PROMEGA, Mannheim)
 - DNA-Leiter 100 bp, Artikelnummer 850321 (BIOZYM DIGNOSTIK, Hess. Oldendorf)

Verbrauchsmaterialien:

- Spinocan[®], Kanüle zur Spinal-Anästhesie 1,3 x 75 mm, Artikelnummer 4501373 (BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen)
- Sterile Spritzen BD DiscarditTM II 2 ml (Artikelnummer 309050), 5 ml (Artikelnummer 300928), 10 ml (Artikelnummer 309110) (BECTON DICKINSON, Fraga, Spanien)
- Kanülen Neolus 20 G x 1 ½“, 0,9 x 40 mm, Artikelnummer NN-2038R35 (TERUMO COOPERATION, Leuven, Belgien)
- Kanülen Neolus 22 G x 1 ¼“, 0,7 x 30 mm, Artikelnummer NN-2232R35, (TERUMO COOPERATION, Leuven, Belgien)
- Sterile Venenverweilkanüle, Klinijekt-V, G 20, 1,0 x 32 mm, Artikelnummer 1201306 (KLINIKA MEDICAL GmbH, Usingen)
- Sterile Venenverweilkanüle, Klinijekt-V, G18, 1,3 x 45 mm, Artikelnummer 1181406 (KLINIKA MEDICAL GmbH, Usingen)
- Venenverweilkatheter für die Vena jugularis „Vygoflex pur“ 0,9 x 1,4 mm, 35 cm, Artikelnummer 9152.514 (VYGON GmbH & Co KG, Aachen)
- Kalium-EDTA Probengefäß 1,3 ml, Artikelnummer 41.1504.005 (SARSTEDT, Nümbrecht)
- Lithium-Heparin Probengefäß 1,3 ml, Artikelnummer 41.1503.005 (SARSTEDT, Nümbrecht)
- Zitrat Probengefäß 1,3 ml, Artikelnummer 41.1506.005 (SARSTEDT, Nümbrecht)
- Objektträger geschnitten mit Mattrand, 76 x 26 mm (3 x 1 inch), Artikelnummer 3614305 (IDL, Nidderau)

- Safeseal-Tips 10 µl (Artikelnummer 693010), 20 µl (Artikelnummer 692151), 100 µl (Artikelnummer 692066), 200 µl (Artikelnummer 692069), 1000 µl (Artikelnummer 692079) (BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf)
- Safe-seal Reagiergefäß 2,0 ml, Artikelnummer 72.695 (SARSTEDT, Nümbrecht)
- Reagiergefäß 1,5 ml, Artikelnummer 72.690 (SARSTEDT, Nümbrecht)
- PCR Softtubes 0,5 ml mit Deckel, Artikelnummer 711010 (BIOZYM, Hess. Oldendorf)
- Polaroid Professional Black & White Instant Pack Film 667 (POLAROID GmbH, Offenbach)

3.1 Patienten

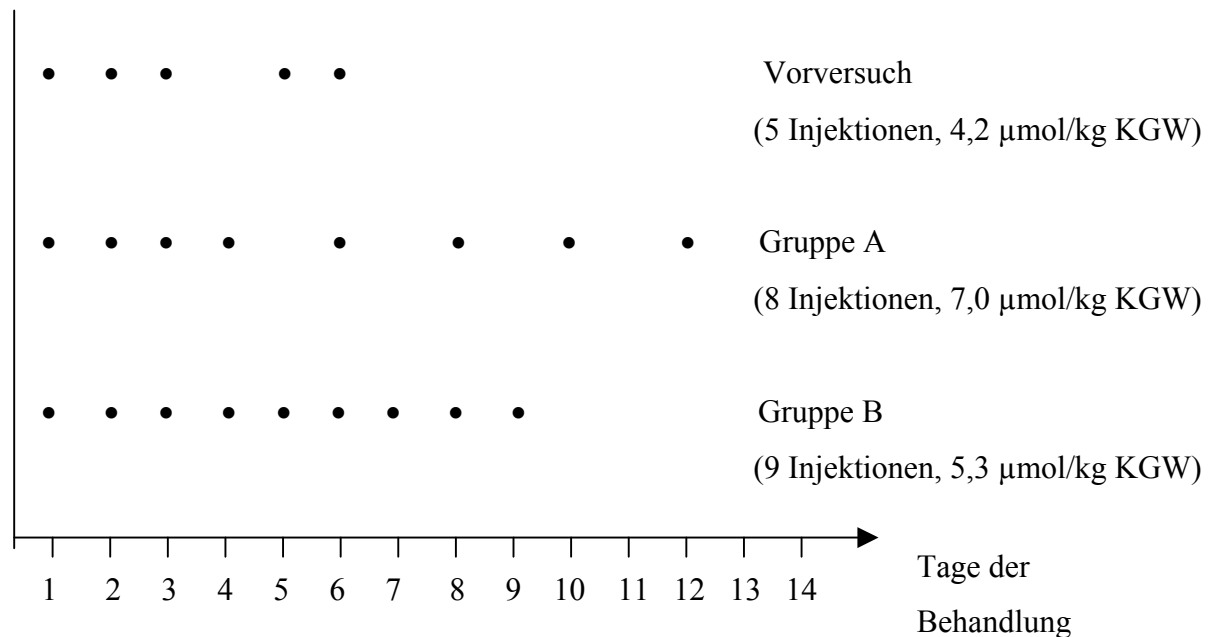
In die klinische Studie wurden insgesamt 24 Hunde unterschiedlicher Rasse, Alters und Geschlechts aufgenommen. Bei allen Patienten handelte es sich ausschließlich um Tiere aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere, die zum Zeitpunkt der Vorstellung nachweislich an kaniner Leishmaniose erkrankt waren. Sie wiesen die für die Erkrankung charakteristischen klinischen und/oder labordiagnostischen Veränderungen auf. In die Untersuchungen gingen sowohl bereits vorbehandelte als auch bisher unbehandelte Patienten ein. Das Vorliegen einer weiteren Infektionskrankheit (z.B. Ehrlichiose) stellte kein Ausschlußkriterium zur Aufnahme des Tieres in die Studie dar. Das Signalement der Tiere sowie wichtige Aspekte der Anamnese sind in Tabelle 30 des Anhangs in einer Übersicht dargestellt.

3.2 Therapieschemata

Der zu applizierende Wirkstoff Ol-PC, welcher von der Firma NOVARTIS (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde, lag in einer liposomalen Formulierung vor. Das Präparat wurde in sterilen Glasstichflaschen aufbewahrt und bis zur Verwendung bei einer Temperatur von 4 – 8° C gekühlt. Vor Entnahme der Flüssigkeit wurde diese gut geschüttelt. Die Verabreichung erfolgte einmal täglich s.c. in wechselseitigen Injektionen an der rechten und linken Brustwand mittels steriler 22 G Kanüle (TERUMO COOPERATION). Abbildung 4 zeigt eine

Übersicht über die Dosierungen und Injektionszeitpunkte der einzelnen Versuchsgruppen (Vorversuch, Gruppe A, Gruppe B).

Abbildung 4: Therapieschemata des Vorversuches und der Hauptversuche: Dosierungen und Injektionszeitpunkte



3.2.1 Vorversuch

Die Applikation des Wirkstoffes erfolgte in einer Dosierung von $4,2 \mu\text{mol/kg KGW}$. Die Patienten dieser Gruppe erhielten jeweils 5 Injektionen (Tag 1, 2, 3, 5 und 6). In diesen Vorversuch wurden 3 Tiere einbezogen, die je einen Behandlungszyklus erhielten.

3.2.2 Hauptversuch

3.2.2.1 Gruppe A

Den Patienten dieser Gruppe wurden in einem Behandlungsintervall jeweils 8 Injektionen (Tag 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12) in einer Dosierung von $7,0 \mu\text{mol/kg KGW}$ verabreicht. 11 Tiere erhielten erstmalig eine Behandlung mit Ol-PC.

3.2.2.2 Gruppe B

In einer Dosierung von 5,3 µmol/kg KGW umfasste ein Behandlungsintervall je 9 Injektionen (Tag 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9). In dieser Gruppe wurden 10 Patienten erstmalig mit Ol-PC behandelt.

3.2.2.3 Therapiewiederholer

Nach dem Rezidiv eines Patienten der Gruppe A (7 Monate nach der ersten Behandlung) wurde dieser erneut mit Ol-PC behandelt. Im Rahmen des zweiten Behandlungsintervalls erhielt der Patient 9 Injektionen. Als nach 19 Monaten wiederum eine Verschlechterung der Symptomatik bei diesem Tier auffiel, wurde ein 3. Therapiezyklus mit 8 Injektionen eingeleitet. Einem Hund der Gruppe B wurden nach dem erneuten Auftreten von Symptomen (2 Monate nach der ersten Behandlung) weitere 9 Injektionen verabreicht. Somit beinhaltet die Gruppe A bei 11 erstmalig mit Ol-PC behandelten Tieren 12 Therapiezyklen. In Gruppe B liegen bei 10 erstmalig mit Ol-PC behandelten Patienten ebenfalls 12 Therapiezyklen vor.

3.3 Untersuchungsplan

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte im Rahmen des vom Regierungspräsidium Giessen am 30.11.2000 genehmigten Tierversuches Gi 18/13 Az II 25.3-19c20/15c (gemäß § 8 a des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.05.1998).

3.3.1 Voruntersuchung

Vor Therapiebeginn wurde sichergestellt, daß das Tier zum Zeitpunkt der Vorstellung an Leishmaniose erkrankt war. Hierzu erfolgte bei allen Patienten eine Untersuchung des Knochenmarkes mittels Zytologie und Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Nur in Einzelfällen wurden Patienten lediglich auf Grund eines erhöhten Leishmanienantikörper-Titers bei gleichzeitigem Vorliegen einer klinischen Symptomatik in die Studie aufgenommen. Die Voruntersuchung umfasste neben dem direkten Erregernachweis eine klinische Untersuchung, in der insbesondere die aktuellen klinischen Veränderungen im Rahmen der Leishmaniose erfasst wurden. Des Weiteren wurden hämatologische und blutchemische Untersuchungen sowie eine Untersuchung der Gerinnung und des Urins durchgeführt. Bestand auf Grund der klinischen Symptomatik oder labordiagnostischer Veränderungen der Verdacht auf weitere Erkrankungen, wurden diese im Rahmen einer weiterführenden Differentialdiagnostik

abgeklärt. Das Vorliegen einer begleitenden Erkrankung wurde in diesem Zusammenhang nicht als Ausschlußkriterium gewertet.

3.3.2 Untersuchungen während des Behandlungsintervalls

Nachdem das Vorliegen einer Leishmaniose sichergestellt werden konnte, wurde das Tier über den Zeitraum der Behandlung stationär in der Klinik für Kleintiere aufgenommen. Entsprechend der Gruppeneinteilung erhielten die Patienten Injektionen des Wirkstoffes in den vorgegebenen zeitlichen Abständen und Dosierungen (siehe Abbildung 4). Während des stationären Aufenthaltes erfolgte eine tägliche Kontrolle des Allgemeinbefindens, der Vitalfunktionen (Futteraufnahme, Wasseraufnahme, Kot- und Urinabsatz) und der rektal gemessenen Körpertemperatur. Die Injektionsstellen wurden täglich in Bezug auf Schwellungen, Schmerzhaftigkeit oder vermehrte Wärme kontrolliert. Die Patienten wurden in Hinsicht auf mögliche Nebenwirkungen überwacht und diese in gegebenem Fall täglich dokumentiert.

Blut- und Urinuntersuchungen erfolgten in regelmäßigen Abständen (in der Regel alle 3 Tage).

3.3.3 Nachuntersuchung

Zur Kontrolle des Therapieerfolges wurde 6 Wochen nach Beendigung der Behandlung eine Nachuntersuchung des Patienten durchgeführt. Konnte ein Hund nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt werden, erfolgte – sofern möglich – eine Beurteilung des Allgemeinzustandes des Tieres (z.B. bezüglich Hautveränderungen, Lethargie, Anorexie, Gewichtsverlust) auf Grund von mündlichen Mitteilungen des Besitzers. Symptome, die auf Grund der mangelnden Fachkenntnis des Besitzers nicht bewertet werden konnten (z.B. Vergrößerung der Lymphknoten) blieben in diesem Fall unberücksichtigt. Die Nachuntersuchung umfasste neben einer klinischen Untersuchung eine erneute Bestimmung der labordiagnostischen Parameter in Blut und Urin. Mittels zytologischer Untersuchung des Knochenmarkes und einer PCR aus Knochenmarkpunktat sollte wiederholt der Erregerstatus bestimmt werden. Angaben des Besitzers zum klinischen Verlauf der Erkrankung im Zeitraum zwischen Entlassung und Kontrolluntersuchung wurden sorgfältig dokumentiert und gegebenenfalls bei der Auswertung der Daten mit einbezogen.

3.4 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung des Patienten diente der Kontrolle des allgemeinen Gesundheitsstatus vor und nach der Therapie. Einschränkungen des Gesundheitsstatus vor Therapiebeginn mussten erfasst werden, um sie gegebenenfalls von zu Behandlungsbeginn einsetzenden Nebenwirkungen besser abgrenzen zu können. Die Beurteilung des Gesundheitsstatus zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung sollte unter anderem die Entwicklung von gegebenenfalls während der Behandlung aufgetretenen Nebenwirkungen dokumentieren. Insbesondere sollten im Rahmen der klinischen Untersuchung die für die Erkrankung charakteristischen Symptome aufgezeichnet und über den Behandlungszeitraum und den sich anschließenden Beobachtungszeitraum erfasst werden. Dies war Grundlage zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit des Präparates. Hierzu zählten folgende, von NOLI (1999) aufgeführten Krankheitsanzeichen der kaninen Leishmaniose: Veränderungen der Haut und des Haarkleides, generalisierte Lymphknotenvergrößerung, blasse Schleimhäute, Gewichtsverlust, Fieber, Lethargie, Anorexie, Niereninsuffizienz, Epistaxis, Arthropathien und Diarrhoe. Die Vorgehensweise der klinischen Untersuchung orientierte sich nach den von JAKSCH und GLAWISCHNIG (1990) herausgegebenen Grundsätzen.

3.5 Remissionszeit

Als Remission wird die Phase zwischen zwei Rezidiven einer Erkrankung bezeichnet. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Remissionszeit als Zeitspanne von einer deutlichen Besserung klinischer oder labordiagnostischer Veränderungen im Anschluß an die Therapie bis zu einer deutlichen Verschlechterung der Symptomatik definiert. Die deutliche Verschlechterung wurde durch die Notwendigkeit einer erneuten, intensiven Therapie (z.B. wiederholte Anwendung von Ol-PC oder Glucantime®) markiert. Das Auftreten geringgradiger Symptome galt nicht als deutliche Verschlechterung. Die Remissionszeit wurde – sofern eruierbar - ebenso dokumentiert, wie – falls notwendig - der Beginn der Gabe von Allopurinol. Diese Daten sind in Tabelle 30 des Anhangs dargestellt.

3.6 Nebenwirkungen

Die im Zusammenhang mit der Medikamentenverabreichung auftretenden unerwünschten Wirkungen wurden täglich erfasst und aufgezeichnet. Neben der Art der Nebenwirkungen sollte vor allen Dingen der Schweregrad der entsprechenden Symptome in den einzelnen

Gruppen dokumentiert werden. Daher wurde in Anlehnung an den klinischen Untersuchungsgang ein Scoring-System entwickelt, welches die Auswertung des Schweregrades der aufgetretenen Nebenwirkungen erlaubt. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Wertung der aufgetretenen Nebenwirkungen. Geringgradige Veränderungen wurden einem niedrigen Zahlenwert gleichgesetzt, hochgradige Veränderungen wurden entsprechend mit einer höheren Bewertungsziffer beschrieben.

Tabelle 5: Bewertungsziffern zur Beurteilung des Schweregrades der aufgetretenen Nebenwirkungen

Art der Nebenwirkung	Klinischer Befund	Bewertungsziffer
Veränderungen der Injektionsstellen	geringgradige Schwellung (< 2 cm)	1
	mittelgradige Schwellung ($\geq 2 - 4$ cm)	2
	hochgradige Schwellung (> 4 cm)	3
	hochgradige Schwellung, schmerzhaft, vermehrt warm	4
Gastrointestinale Symptome	Inappetenz	1
	Anorexie	2
	Vomitus	2
	breiiger Kotabsatz	1
	wässrige Diarrhoe	2
	blutig-wässrige Diarrhoe	3
erhöhte Körpertemperatur/Fieber	erhöhte Körpertemperatur ($39,5 - 40^{\circ}$ C)	1
	Fieber ($>40,0^{\circ}$ C)	2

3.7 Labordiagnostische Untersuchungen

3.7.1 Blutuntersuchung

Untersuchungen des Blutes vor Therapiebeginn dienten neben der Erfassung des allgemeinen Gesundheitsstatus des Patienten vor allem der Erkennung charakteristischer labordiagnostischer Veränderungen im Rahmen der kaninen Leishmaniose. Die hämatologischen und blutchemischen Befunde wurden während der Therapie regelmäßig kontrolliert. Die Effektivität des Wirkstoffes konnte auf diese Weise dokumentiert werden. Außerdem bestand somit die Möglichkeit zur frühzeitigen Erkennung von Nebenwirkungen des Präparates auf die einzelnen Organsysteme. Die Untersuchung des Blutes 6 Wochen nach der Entlassung des Tieres wurde sowohl zur Kontrolle des allgemeinen Gesundheitsstatus durchgeführt als auch zur Überprüfung des Therapieerfolges und der gegebenenfalls während der Therapie aufgetretenen Nebenwirkungen.

Die Entnahme der Blutproben erfolgte nach perkutaner Punktion (TERUMO COOPERATION) der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena lateralis. Bei Patienten, die auf Grund intensiver, begleitender therapeutischer Maßnahmen eine Venenverweilkanüle (KLINIK MEDICAL) oder einen zentralen Venenkatheter (VYGON) erhielten, erfolgte die Blutentnahme aus den entsprechenden venösen Zugängen. Die Proben wurden in geeignete Probengefäße (SARSTEDT) verbracht und zur weiteren Untersuchung in das Labor der Klinik für Kleintiere weitergeleitet.

Untersuchungen des roten und weissen Blutbildes erfolgten unter Verwendung von EDTA-Blut mit dem Hämatologie System ADVIA 120 (BAYER DIAGNOSTICS). Hierbei wurden folgende Parameter erfasst: Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt der Erythrozyten, Hämatokrit, Retikulozytenzahl, Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild.

Mittels ADVIA 120 (BAYER DIAGNOSTICS) wurden aus EDTA-Blut neben der Thrombozytenzahl auch die Parameter der Thrombozytenaktivierung bestimmt. Hierzu zählten MPC (mean platelet component concentration) und PCDW (platelet component distribution width).

Als Parameter der Gerinnung wurden Prothrombinzeit (PT), partielle Thromboplastinzeit (PTT) und die Fibrinogenkonzentration ermittelt. Ferner wurde als Globaltest für die

Gerinnung ein Resonanzthrombelastogramm (RTG) durchgeführt. Die Erfassung der Gerinnungszeiten (PT und PTT) und der Fibrinogenkonzentration erfolgte mittels Koagulometermethode nach Schnitger und Gross (SIGMA-AMELUNG). Ebenso wie zur Durchführung des RTG unter Einsatz des Resonanzthrombographs RTG-S 801 (FRESENIUS MEDIZINTECHNIK) wurde Zitratblut bzw. Zitratplasma verwendet.

Zur Untersuchung blutchemischer Parameter wurde das heparinisierte Blut zunächst bei 10.000 U/min zentrifugiert (HETTICH) und das überstehende Plasma abpipetiert. Die Messung erfolgte dann mit Hilfe des naßchemischen Gerätes Cobas Mira (ROCHE DIAGNOSTICA). Als direkte Leberparameter wurden hierbei die Aktivitäten der Leberenzyme Alanin-Amino-Transferase (ALT), alkalische Phosphatase (AP) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) im heparinisierten Blutplasma bestimmt. Als indirekte Leberparameter wurden die Konzentrationen des Gesamtbilirubins, des direkten Bilirubins, des Cholesterins und der Glukose ermittelt. Der Anteil des indirekten Bilirubins errechnete sich aus der Differenz von Gesamtbilirubin und direktem Bilirubin.

Unter Verwendung des Gerätes Cobas Mira (ROCHE DIAGNOSTICA) erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen der Nierenparameter Harnstoff und Kreatinin in heparinisiertem Blutplasma. Die Blutplasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, ionisiertem Kalzium, Chlorid und anorganischem Phosphat wurden ebenfalls in den heparinisierten Proben am Cobas Mira (ROCHE DIAGNOSTICA) gemessen.

Die Messung der Enzymaktivitäten der Pankreasparameter α -Amylase und Lipase sowie die Konzentrationen der Parameter des Eiweißstoffwechsels Gesamteiweiß und Albumin erfolgte mittels heparinisierter Blutplasmaproben am Gerät Cobas Mira (ROCHE DIAGNOSTICA). Der Anteil des Globulins wurde aus der Differenz von Gesamteiweiß und Albumin berechnet.

3.7.2 Urinuntersuchung

Die Untersuchung des Urins diente neben der Bestimmung des allgemeinen Gesundheitsstatus vor allem der Erfassung und Kontrolle der krankheitsbedingten, von der Norm abweichenden Parameter (v.a. Parameter der Nierenfunktion) vor, während und nach der Therapie. Hierbei erfolgten Messungen der Protein-, Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen unter Einsatz des Gerätes Cobas Mira (ROCHE DIAGNOSTICA). Mit Hilfe eines Teststreifens (ROCHE DIAGNOSTICA) wurden semiquantitativ neben Eiweiß, Glukose, Hämoglobin und Bilirubin

auch Urobilinogen, Nitrit und Keton bestimmt. Des Weiteres erfolgte mit Hilfe dieses Teststreifens die Ermittlung des pH-Wertes. Zur Untersuchung des spezifischen Gewichtes fand ein Refraktometer (A. KRÜSS OPTRONIC) Einsatz. Zur Bewertung des Sedimentes erfolgte eine mikroskopische Untersuchung nach Zentrifugation (HETTICH).

Die aufgeführten Untersuchungen wurden unmittelbar nach der Gewinnung des Urins im Labor der Klinik für Kleintiere durchgeführt.

3.8 Weiterführende Untersuchungen

3.8.1 Mikroskopischer Erregernachweis mittels Knochenmarkzytologie

Der mikroskopische Erregernachweis im Knochenmark wurde zur Bestimmung des Erregerstatus vor und 6 Wochen nach Abschluß der Therapie in Ergänzung zur PCR durchgeführt. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob mittels Therapie mit Ol-PC eine Erregerfreiheit im Knochenmark und in diesem Sinne eine Heilung erzielt werden kann. Ein postiver Zytologiebefund vor Therapie wurde außerdem als ein Aufnahmekriterium in die klinische Studie bewertet. Neben dem Erregernachweis bot die mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkpunktaten die Möglichkeit zur Beurteilung der Myelopoese, der Erythropoese und der Megakaryopoese vor und nach der Therapie bei Patienten mit entsprechenden Blutbildveränderungen.

Die Punktion des Knochenmarkes erfolgte am Tuber sacrale des stehenden Tieres nachdem die Haare über dem Kreuzbeinhöcker geschoren und die Haut anschließend desinfiziert wurde. Mittels 2%igem Lidocainhydrochlorid (ASTRA ZENECA) wurde eine Lokalanästhesie der Haut, des Unterhautgewebes und des Periostes an der Punktionsstelle durchgeführt. Das Knochenmark konnte nun mit Hilfe einer Spezialkanüle (BRAUN MELSUNGEN AG) unter drehenden Bewegungen punktiert und unter Verwendung einer 10-ml-Spritze (BECTON DICKINSON) aspiriert werden. Mittels Punktion wurde von jedem Patienten ein Volumen von ca. 0,5 ml Knochenmark gewonnen.

Ein Teil des Probenmaterials wurde auf Objektträgern (IDL) ausgestrichen. Nach Lufttrocknung wurden die Ausstriche im Labor der Klinik für Kleintiere nach Pappenheim (MERCK) gefärbt und zur Beurteilung in die zytologische Abteilung weitergeleitet. Das

verbleibende Probenmaterial wurde in EDTA-Probengefäße (SARSTEDT) verbracht und bis zum Einsatz in die unter Punkt 3.8.2 beschriebene PCR bei -20°C eingefroren.

3.8.2 Direkter Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.8.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die PCR zum direkten Nachweis von Leishmanien diente der Feststellung des Erregerstatus im Knochenmark vor und nach Therapie mit Ol-PC. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob eine Behandlung mit dem Präparat zur Erregerfreiheit im Knochenmark und in diesem Sinne zu einer Heilung führen kann.

Als Probenmaterial fanden Knochenmarkpunktate mit einem Volumen von ca. 0,25 ml Verwendung, welche nach Gewinnung (siehe die in 3.8.1 beschriebene Vorgehensweise) in EDTA-Probenröhrchen (SARSTEDT) verbracht und bei -20°C bis zu ihrem Einsatz in die PCR gelagert wurden. Aus den Proben wurde zunächst die DNA isoliert und im Anschluß die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt. Nach Verdünnung des Probenmaterials erfolgte die Durchführung der PCR. Die Proben wurden nach der PCR mittels Elektrophorese auf einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel aufgetrennt und die Ergebnisse mittels Fotografie dokumentiert. Der Erregernachweis wurde im Labor der Klinik für Kleintiere durchgeführt.

3.8.2.2 Primerauswahl

Da bei 23 Patienten der Studie (1 Tier unbekannter Herkunft) auf Grund ihrer Auslandsanamnestik wahrscheinlich eine natürliche Infektion in südeuropäischen Ländern zu Grunde liegt, wurden in der vorliegenden Untersuchung hochsensitive Primer für *L. infantum* verwendet. Als Primer der genomischen DNA des Parasiten wurden die von PIARROUX et al. (1993) veröffentlichten Oligonukleotidsequenzen eingesetzt. Das resultierende Amplifikat weist eine Länge von 100 Basenpaaren (bp) auf.

Um die sachgemäße Isolierung von DNA aus dem Knochenmark sicherzustellen, wurde vor dem Nachweis des Erregererbgutes eine PCR beruhend auf dem „house-keeping“ Gen GAPDH (Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt. Die Auswahl der Primer stützte sich hierbei auf die von GRÖNE et al. (1999) publizierten Sequenzen, die ein Amplifikat von 229 bp-Länge bedingen.

Die Primer für GAPDH und *L. infantum* wurden von der Firma MWG-Biotech in Ebersberg hergestellt, nach der Anlieferung auf 100 pmol/μl mit nukleasefreiem Wasser (PROMEGA) vorverdünnt und entsprechende Aliquots bei –20° C gelagert. Vor Einsatz in die PCR wurden die Oligonukleotide auf eine Konzentration von 10 pmol/μl mittels nukleasefreiem Wasser (PROMEGA) erneut verdünnt. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Primersequenzen

Primer (interne Bezeichnung)	Sequenz	Länge des Amplikons
GAPDH S (GAPDH“fwd)	GGG GCC ATC CAC AGT CTT CT	229 bp
GAPDH AS (GAPDH“rev)	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	
Leishmania infantum S (L.inf,Steu“fwd)	ACG AGG TCA GCT CCA CTC C	100 bp
Leishmania infantum AS (L.inf,Steu“rev)	CTG CAA CGC CTG TGT CTA CG	

3.8.2.3 Kontrollen der PCR

Um die vollständige Zusammensetzung der Reaktionsansätze und den einwandfreien Ablauf einer PCR nachzuweisen, wurde neben den Proben jeweils eine PCR mit positiver Kontroll-DNA durchgeführt. Als Positivkontrolle diente isolierte DNA leishmaniosekranker Hunde, deren Parasitennachweis in einem unabhängigen veterinärmedizinischen Labor (Laboklin, Ludwigshafen) durchgeführt wurde. Da sichergestellt werden musste, daß die Reagenzien vor dem Einsatz in den Thermocycler nicht mit Ziel-DNA verunreinigt waren, fand als Negativkontrolle statt der DNA ein entsprechendes Volumen von nukleasefreiem Wasser (PROMEGA) Einsatz in die PCR.

3.8.2.4 DNA-Isolierung

Die Isolierung von DNA aus Knochenmark erfolgte mittels DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). Das vom Hersteller angegebene Protokoll wurde zur Optimierung der Ausbeute in Rücksprache mit dem Hersteller modifiziert.

Hierzu wurden in einem 2 ml fassenden Reaktionsgefäß (SARSTEDT) 40 µl der Proteinase K mit 200 µl des Knochenmarkes sowie 200 µl 1fach konzentrierten PBS-Phosphatpuffers (BAG) mit 400 µl AL-Puffer gemischt und bei 70° C für 20 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol (ROTH) und sorgfältigem Mischen erfolgte der Auftrag von 620 µl des Probenvolumens auf die vom Hersteller gelieferten Säulen und die einminütige Zentrifugation bei 4000 x g und Raumtemperatur (EPPENDORF). Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500 µl des AW1-Puffers auf die Säule aufgetragen und erneut 1 Minute bei 4000 x g zentrifugiert. Der hierbei entstandene Durchfluß wurde wiederum verworfen. Im Anschluß erfolgte ein weiterer Waschschriff durch die Zugabe von 500 µl des AW2-Puffers auf die Säule. Es schloß sich eine 3 minütige Zentrifugation bei 13000 x g an. Die Elution der DNA aus der Membran erfolgte nach Umsetzen des Filtereinsatzes auf ein neues, steriles Reaktionsgefäß und Zugabe von 100 µl AE-Puffer sowie Inkubation bei Raumtemperatur über 5 Minuten und anschließender Zentrifugation (1 Minute bei 4000 x g). Der hieraus resultierende Durchfluß beinhaltete die isolierte und gereinigte DNA, welche in die PCR eingesetzt werden konnte. Die noch verbliebenen 620 µl Probenvolumen konnten nun auf die bereits verwendete Säule aufgebracht und die DNA nach den beschriebenen Reaktionsschritten ebenfalls eluiert werden.

Nach Extraktion der DNA wurde für jede Probe die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm) mittels Spektrometer (AMERSHAM BIOSCIENCES) bestimmt und hieraus die Konzentration der Nukleinsäuren ermittelt. Darüber hinaus wurde die Proteinkontamination der Probe aus dem Verhältnis von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ ermittelt.

3.8.2.5 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR fand der Thermocycler PTC-200 (BIOZYM DIAGNOSTIK) Einsatz. Dieses Gerät ist mit einem heizbaren Deckel ausgestattet und arbeitet mit dem Pelitier-Joul Heiz/Kühlsystem.

Jeder PCR-Ansatz –sowohl für die PCR des „house-keeping“ Gens GAPDH als auch für die PCR der parasitären DNA - wies ein Gesamtvolumen von 100 µl auf, welches sich aus 50 µl Master-Mix und 50 µl Probenansatz zusammensetzte. Da jeder Probenansatz mindestens 0,5 µg DNA beinhalten sollte, erfolgte in Abhängigkeit von der Konzentration der isolierten DNA eine Verdünnung des Probenmaterials auf 50 µl. Bei Proben mit einer geringen Konzentration von DNA wurden maximal 15 µl des Probenmaterials zur Herstellung des Probenansatzes verwendet.

3.8.2.5.1 PCR des „house-keeping“ Gens GAPDH

Die Zusammensetzung des Master-Mixes für die PCR des „house-keeping“ Gens wird in Tabelle 7 dargestellt.

Nachdem in einem für die PCR geeignetem Reaktionsgefäß je 50 µl des Master-Mixes mit je 50 µl des Probenansatzes versetzt wurde, erfolgte der Einsatz der Proben in den Thermocycler (BIOZYM DIAGNOSTIK). In 40 Zyklen erfolgte zunächst eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94° C über 1 Minute. Im Anschluß lagerten sich die Primer bei 59,5° C über eine Dauer von 2 Minuten an. Eine Verlängerung der Primer erfolgte über 1 Minute bei 72° C. Abweichend hiervon beträgt die Phase der Denaturierung im 1. Zyklus 10 Minuten. Im letzten Zyklus ermöglichte eine verlängerte Elongationsphase von 10 Minuten die vollständige Synthese der DNA-Stränge. Nach Beendigung der 40 Zyklen erfolgte eine Kühlung der Proben bei 4° C und eine anschließende Lagerung bei –20° C.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mixes für die GAPDH-PCR

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Menge pro Ansatz [µl]
Nukleasefreies Wasser			21,5
10fach PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl	10,0
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	6,0
dNTP-Mix 10 mM	2,5 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP	8,0
Primer (S)	10 pmol/µl	0,2 pmol/µl	2,0
Primer (AS)	10 pmol/µl	0,2 pmol/µl	2,0
Ampli Taq Gold Polymerase	5 Units/µl	0,025 Units/µl	0,5

3.8.2.5.2 PCR der DNA von *Leishmania infantum*

Die Zusammensetzung des Master-Mixes für die PCR der DNA von *L. infantum* geht aus Tabelle 8 hervor.

Nach Zugabe von je 50 µl der vorverdünnten Probe zu je 50 µl des Master-Mixes wurden die Proben in den Thermocycler (BIOZYM DIAGNOSTIK) eingebracht und nach folgendem Protokoll über 40 Zyklen behandelt: Nach Denaturierung der DNA bei 94° C erfolgte die Anlagerung der Primer bei 59° C. Die sich anschließende Elongationsphase fand bei einer Temperatur von 72° C statt. Jeder Reaktionsschritt dauerte 30 Sekunden. In Abweichung hierzu wies der 1. Zyklus eine verlängerte Denaturierungsphase und der letzte Zyklus eine verlängerte Elongationsphase von jeweils 10 Minuten auf. Die Proben wurden im Anschluß an insgesamt 40 Zyklen auf 4° C gekühlt. Konnte die Auswertung der Proben nicht unmittelbar im Anschluß an die PCR erfolgen, wurden diese zunächst bei einer Temperatur von –20° C gelagert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Master-Mixes für die *L. infantum*-PCR

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Menge pro Ansatz [µl]
Nukleasefreies Wasser			19,5
10fach PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl	10,0
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	6,0
dNTP-Mix 10 mM	2,5 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP	8,0
Primer (S)	10 pmol/µl	0,3 pmol/µl	3,0
Primer (AS)	10 pmol/µl	0,3 pmol/µl	3,0
Ampli Taq Gold Polymerase	5 Units/µl	0,025 Units/µl	0,5

3.8.2.6 Auswertung der PCR

Im Anschluß an die PCR erfolgte die Auftrennung der amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurde zunächst ein 2%iges Agarosegel (siehe Anhang) hergestellt, welches mit Ethidiumbromid (MERCK) gefärbt wurde. Nach Trocknung des Geles wurde dieses in horizontaler Lage in die mit 1x TBE Elektrophoresepuffer (siehe Anhang) befüllte Elektrophoresekammer (BIOZYM DIAGNOSTIK) eingebracht. Die Applikation einer 100bp-Leiter (BIOZYM DIAGNOSTIK) in die erste Tasche des Geles ermöglichte nach der Elektrophorese die Identifikation der Amplifikate anhand ihrer Größe. Die zweite und dritte Tasche beinhalteten jeweils eine Positiv- bzw. Negativkontrolle. In alle weiteren Taschen wurden die Patientenproben pipettiert. Jede Probe wies ein Gesamtvolumen von 25 µl auf, welche sich aus je 20 µl des PCR-Produktes sowie 5 µl Laufpuffer (PROMEGA) zusammensetzte.

Nach einer Laufzeit von 90 Minuten bei einer angelegten Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 180 mA wurde das Gel der Elektrophoresekammer entnommen. Durch die Färbung mit Ethidiumbromid (MERCK) konnten die Amplifikate nun im Transluminator (BENDA) mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar

gemacht werden. Das Ergebnis wurde unter Verwendung einer Photoeinheit (POLAROID) mit zugehörigem Tubussystem (POLAROID) und geeigneten Schwarz-Weiß-Filmen (POLAROID) dokumentiert. Die Belichtungszeit betrug jeweils 1/2 Sekunde. Die Blende entsprach dem Wert 8.

3.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Failing und Herrn Heiter von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Institutes für Veterinärphysiologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität (JLU) in Giessen.

Zur Überprüfung der klinischen Wirksamkeit des Präparates wurde jedes Symptom eines Patienten vor Behandlungsbeginn dokumentiert und Veränderungen der klinischen Symptomatik unter der Anwendung von Ol-PC festgehalten. In die statistische Auswertung fanden im Anschluß lediglich Symptome Eingang, die bei mindestens 5 Patienten vertreten waren. Krankheitsanzeichen, die nur in Einzelfällen diagnostiziert wurden, blieben bei der statistischen Auswertung unberücksichtigt. Die Analyse erfolgte mittels McNemar-Test. Sie wurde sowohl bezüglich spezifischer Symptome als auch für die Gesamtheit aller Symptome durchgeführt. Neben einer gruppenübergreifenden Auswertung, bei der die Befunde von Vorversuch, Gruppe A und Gruppe B gemeinsam ausgewertet wurden, interessierte vor allem auch die vergleichende Auswertung zwischen den Ergebnissen der Gruppe A und Gruppe B. Die gruppenübergreifende Auswertung muß eingeschränkt beurteilt werden, da die unterschiedlichen Dosierungen und Injektionszeitpunkte in den einzelnen Gruppen hierbei unberücksichtigt bleiben.

Neben den klinischen Veränderungen galt es, die Veränderungen labordiagnostischer Parameter (Hämatologie, Blutchemie, Gerinnung und Urin) zu erfassen und statistisch auszuwerten. Zu diesem Zweck wurde in den Gruppen A und B eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholungen im Faktor „Zeit“ und im Anschluß ein Wald-Test durchgeführt. Die zwei Faktoren stellen die Patientengruppe und den Untersuchungstag dar. Die Meßwiederholungen beziehen sich auf die Tage der laufenden Behandlung. Rechtsschiefe Daten wurden vor der Auswertung logarithmisch transformiert. Einige Daten des Vorversuches (Leukozyten, Hämatokrit, Thrombozyten und MPC) wurden mittels

einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ auf signifikante Veränderungen überprüft.

Um einen Gruppenvergleich bezüglich der medianen Remissionszeit zwischen Gruppe A und Gruppe B zu ermöglichen, wurde der sogenannte Log-Rank-Test durchgeführt. Auch hier mussten die Daten auf Grund einer rechtsschiefen Verteilung zunächst logarithmisch transformiert werden.

Zur Beurteilung aufgetretener Nebenwirkungen wurden diese im Rahmen eines Scoring-Systems in Abhängigkeit vom Schweregrad zunächst mit einem Zahlenwert versehen. Nach Abschluß der Therapie eines Patienten erfolgte die Addition der täglich ermittelten Werte bezüglich einer spezifischen Nebenwirkung. Nach Logarithmisierung der Daten erlaubte der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test einen Vergleich zwischen den Gruppen A und B hinsichtlich signifikanter Unterschiede des Schweregrades der Nebenwirkungen.

Die Untersuchung bezüglich signifikanter Unterschiede des Erregerstatus im Knochenmark vor und nach der Therapie basierte –ebenso wie die Bewertung der klinischen Wirksamkeit– auf dem McNemar-Test. Neben der gruppenspezifischen Auswertung für die Gruppen A und B wurde auch in diesem Fall ein gruppenübergreifender Vergleich, der die Befunde des Vorversuchs, der Gruppe A und der Gruppe B umfasst, durchgeführt. Die gruppenübergreifende Analyse darf auch in diesem Fall aus den bereits erwähnten Gründen nur eingeschränkt beurteilt werden.

Folgende Bezeichnungen wurden bei der Benennung von Signifikanzen angewendet:

$p \leq 0,05$: signifikant = s.

$p > 0,05$: nicht signifikant = n.s.

Zur Verarbeitung des Datenmaterials fand das Statistikprogrammpaket BMDP/DYNAMIC Release 7.0 (BMDP STATISTICAL SOFTWARE) Einsatz.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten

Die Daten der mit Ol-PC behandelten Patienten sollen in diesem Abschnitt hinsichtlich ihres Alters, des Geschlechtes, der Rasse und des Gewichtes sowie ihrer Auslandsanamnestik, der bisherigen Therapie der Leishmaniose und in Hinsicht auf das Vorliegen weiterer Reisekrankheiten zusammenfassend dargestellt werden. Hierzu wurde der Status jedes Patienten vor Therapiebeginn erfasst. Therapiewiederholer gingen erneut in die Erfassung ein, um neben einer vollständigen Auswertung der Befunde insbesondere auch die Dokumentation veränderter Daten (v.a. Alter, Gewicht, Vorbehandlung) zu gewährleisten. Somit beziehen sich die Angaben auf die bei 24 Patienten durchgeführten 27 Therapiezyklen. Die Einzeltierbefunde werden in der Tabelle 30 des Anhangs aufgeführt.

4.1.1 Alter der Patienten

Die in Tabelle 9 dargestellte Altersverteilung in den einzelnen Gruppen zeigt, daß die Mehrheit der Tiere ein Alter von 1 bis 8 Jahren aufwies ($n = 25$, das entspricht 92,6 %). Der prozentuale Anteil der bis zu 4 Jahre alten Patienten beträgt 70,3 % ($n = 19$). Sehr junge Tiere (jünger als 1 Jahr) wurden nicht zur stationären Behandlung mit Ol-PC vorgestellt. Der Anteil der Tiere über 8 Jahre betrug lediglich 7,4 % ($n = 2$).

Tabelle 9: Altersverteilung der behandelten Tiere (n = 27)

Patienten- gruppe	< 1 Jahr	1 - 2 Jahre	2 - 4 Jahre	4 - 8 Jahre	> 8 Jahre	Durchschnitts- alter
Vorversuch	0	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	0	4,0
Gruppe A	0	2 (7,4 %)	5 (18,5 %)	3 (11,1 %)	2 (7,4 %)	5,2
Gruppe B	0	5 (18,5 %)	5 (18,5 %)	2 (7,4 %)	0	3,3
insgesamt	0	8 (29,6 %)	11 (40,7 %)	6 (22,2 %)	2 (7,4 %)	4,2

Das Durchschnittsalter aller Patienten lag bei 4,2 Jahren. Jedoch wiesen Patienten der Gruppe A durchschnittlich ein höheres Alter auf als Patienten der Gruppe B.

4.1.2 Geschlechtsverteilung

Die Behandlung der leishmaniosekranken Patienten erfolgte 15 mal bei weiblichen Tieren (das entspricht 55,5 %) und wurde 12 mal bei männlichen Tieren durchgeführt (das entspricht 44,4 %). Somit lag eine gleichmäßige Verteilung der Geschlechter vor. In der Studie überwogen weiblich kastrierte Tiere und männlich nicht kastrierte Hunde. Sie stellten jeweils ein Drittel in der gesamten Patientenzahl dar (n = 9 oder 33,3 %). Während in der Gruppe A ein deutlich erhöhter Anteil weiblicher Tiere zu verzeichnen war (n = 10 bzw. 83,3 %) dominierten in der Gruppe B männliche Tiere (n = 8 bzw. 66,7 %). Die Geschlechtsverteilung der Patienten ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Geschlechtsverteilung der behandelten Patienten (n = 27)

Patienten- gruppe	w	wk	m	mk
Vorversuch	1 (3,7 %)	0	2 (7,4 %)	0
Gruppe A	5 (18,5 %)	5 (18,5 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)
Gruppe B	0	4 (14,8 %)	6 (22,2 %)	2 (7,4 %)
insgesamt	6 (22,2 %)	9 (33,3 %)	9 (33,3 %)	3 (11,1 %)

4.1.3 Rassen- und Gewichtsverteilung

Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, überwogen im Patientengut der Studie die Mischlingshunde (n = 17 oder 63,0 %). Nur bei 37,0 % der Tiere (n = 10) handelte es sich um reinrassige Hunde. Die Mehrheit der Patienten (n = 19 oder 70,4 %) wies ein Gewicht von über 20 kg auf. Tiere mit einem Gewicht von bis zu 5 kg wurden nicht zur Behandlung vorgestellt. Auffällig ist der hohe Anteil von Mischlingshunden über 20 kg. Er betrug 37,0 % (n = 10) in Bezug auf alle an der Studie teilnehmenden Hunde.

Tabelle 11: Gewichts- und Rasseverteilung der behandelten Patienten (n = 27)

Patienten- gruppe	< 5 kg	5 - 10 kg	10 - 20 kg	> 20 kg	Mischlinge
Vorversuch	0	0	0	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)
Gruppe A	0	0	3 (11,1 %)	9 (33,3 %)	8 (29,6 %)
Gruppe B	0	3 (11,1 %)	2 (7,4 %)	7 (25,9 %)	8 (29,6 %)
insgesamt	0	3 (11,1 %)	5 (18,5 %)	19 (70,4 %)	17 (63,0 %)

4.1.4 Auslandsanamnestik

Die Mehrzahl der Tiere, die eine Behandlung mit Ol-PC erhielten, wurde in südeuropäischen Ländern geboren und von dort nach Deutschland verbracht ($n = 24$ oder $88,9\%$). $70,4\%$ ($n = 19$) aller an der Studie teilnehmenden Hunden wurden aus Spanien importiert. Nur bei einem geringen Anteil der Patienten ($n = 2$ oder $7,4\%$) erfolgte die Infektion im Zusammenhang mit einem Urlaubsaufenthalt in endemischen Gebieten. Bei 1 Hund (das entspricht $3,7\%$) ist die Auslandsanamnestik unbekannt. Tabelle 12 fasst die wesentlichen Aspekte über die Herkunft der Patienten zusammen.

Tabelle 12: Auslandsanamnestik der Patienten ($n = 27$)

Patienten- gruppe	Import aus Griechenland, Italien oder Portugal	Import aus Spanien	Urlaub in Südeuropa	Unbekannte Auslandsanam- nestik
Vorversuch	2 (7,4 %)	1 (3,7 %)	0	0
Gruppe A	1 (3,7 %)	9 (33,3 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)
Gruppe B	2 (7,4 %)	9 (33,3 %)	1 (3,7 %)	0
insgesamt	5 (18,5 %)	19 (70,4 %)	2 (7,4 %)	1 (3,7 %)

Kein Tier wurde nach der Therapie mit Ol-PC erneut in endemische Gebiete verbracht.

4.1.5 Vorbehandlung

Da eine Vorbehandlung der Leishmaniose bei den Patienten kein Ausschlußkriterium aus der Studie darstellte, wurden sowohl behandelte als auch bisher unbehandelte Tiere in die Studie aufgenommen.

11 Tiere erhielten vor der Therapie mit Ol-PC noch keine Behandlung der Leishmaniose (dies entspricht $40,7\%$). Ein Drittel der Tiere ($n = 9$ oder $33,3\%$) war ausschließlich mit Allopurinol vorbehandelt. Bei 4 Hunden ($14,8\%$) wurde zuvor bereits Allopurinol und Glucantime[®] eingesetzt. Da zwei Hunde wiederholt mit Ol-PC behandelt wurden (ein Hund

erhielt eine weitere Therapie, ein Hund wurde zwei weitere Male mit Ol-PC behandelt) betrug der prozentuale Anteil der wiederholten Therapien mit Ol-PC 11,1 % (n = 3). Die prozentuale Verteilung der vorbehandelten Patienten ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Bisherige Therapie der mit Ol-PC behandelten Hunde (n = 27)

Patienten- gruppe	nicht vor- behandelt	Allopurinol	Glucantime®	Allopurinol und Glucan- time®	Ol-PC und Allopurinol
Vorversuch	1 (3,7 %)	0	0	2 (7,4 %)	0
Gruppe A	7 (25,9 %)	4 (14,8 %)	0	0	1 (3,7 %)
Gruppe B	3 (11,1 %)	5 (18,5 %)	0	2 (7,4 %)	2 (7,4 %)
insgesamt	11 (40,7 %)	9 (33,3 %)	0	4 (14,8 %)	3 (11,1 %)

4.1.6 Vorliegen weiterer Reisekrankheiten

Lagen bei den Patienten auf Grund der klinischen Symptomatik oder auf Grund labordiagnostischer Veränderungen Hinweise auf eine weitere Auslandserkrankung vor (Ehrlichiose, Babesiose oder Dirofilariose), wurden diese ebenfalls abgeklärt. So konnte bei zwei Patienten (das entspricht 7,4 %) der Gruppe A eine Coinfektion mit Ehrlichien nachgewiesen werden. Einer der beiden Patienten (3,7 %) wies zudem eine Infektion mit Babesien auf.

4.2 Klinische Wirksamkeit

Zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit des Präparates wurde neben der Besserung der klinischen Symptomatik auch die Dauer der Remissionszeit berücksichtigt.

4.2.1 Klinische Symptomatik vor Therapie

Die prozentuale Häufigkeit charakteristischer klinischer Symptome der in die Studie einbezogenen Patienten wird in Tabelle 14 zusammenfassend dargestellt. Aus Tabelle 15 geht die Häufigkeit der beobachteten Hautveränderungen hervor.

Tabelle 14: Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

Symptom	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	insgesamt
Hautveränderungen	1 (3,7 %)	9 (33,3 %)	9 (33,3 %)	19 (66,7 %)
Lethargie	0	9 (33,3 %)	8 (29,6 %)	17 (63,0 %)
Generalisierte Lymphknotenvergrößerung	1 (3,7 %)	6 (22,2 %)	9 (33,3 %)	16 (59,3 %)
Blasse Schleimhäute	2 (7,4 %)	8 (29,6 %)	3 (11,1 %)	13 (48,1 %)
Bewegungsstörungen	0	4 (14,8 %)	3 (11,1 %)	7 (25,9 %)
Gewichtsverlust	0	5 (18,5 %)	1 (3,7 %)	6 (22,2 %)
Epistaxis	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)	5 (18,5 %)
Niereninsuffizienz	0	2 (7,4 %)	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)
Fieber	0	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	2 (7,4 %)
Anorexie	0	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	2 (7,4 %)
Diarrhoe	1* (3,7 %)	0	0	1 (3,7 %)

* In einer Kotuntersuchung wurde Clostridium perfringens +++ nachgewiesen

Tabelle 15: Ergebnisse der klinischen Untersuchungen (Hautveränderungen)

Symptom	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	Insgesamt*
Exfoliative Dermatitis	1 (3,7 %)	7 (41,1 %)	7 (41,1 %)	15 (78,9 %)
Periorbitale Alopezie	1 (3,7 %)	2 (7,4 %)	4 (23,5 %)	7 (41,1 %)
Ulzerierende Hautknoten	0	3 (11,1 %)	4 (23,5 %)	7 (41,1 %)
Diffuse Alopezie	1 (3,7 %)	4 (23,5 %)	2 (7,4 %)	7 (41,1 %)
Nicht ulzerierende Hautknoten	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)	2 (7,4 %)	6 (35,3 %)
Onychogrypose	0	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)	4 (23,5 %)

* Der prozentuale Anteil bezieht sich auf die Patienten mit Hautveränderungen

66,7 % (n = 19) der zur Therapie vorgestellten Patienten litten unter Veränderungen der Haut. 78,9 % (n = 15) der betroffenen Hunde zeigten hierbei eine exfoliative Dermatitis. Weitere häufige Symptome der Haut stellten mit jeweils 41,1 % (n = 7) Ulzera (Abbildung 5 und 6), diffuse Alopezie und periorbitale Alopezie dar. Über ein Drittel dieser Patienten (n = 6 oder 35,3 %) wies nicht ulzerierende Hautknoten auf. Fast ein Viertel der Patienten (n = 4 bzw. 23,5 %) zeigte im Rahmen einer kutanen Symptomatik eine Onychogrypose (Abbildung 7).

Abbildung 5: Hochgradige Ulzera an den Ohrrändern (Patient Nr. 11)



Abbildung 6: Ulzera auf dem Nasenrücken (Patient Nr. 11)



Abbildung 7: Lange und brüchige Krallen (Patient Nr. 11)



Neben Veränderungen der Haut waren bei der Mehrheit der Patienten Lethargie ($n = 17$ oder 63,0 %) und generalisiert vergrößerte Lymphknoten ($n = 16$ oder 59,3 %) zu verzeichnen. Fast die Hälfte der zur Therapie vorgestellten Hunde (48,1 % oder $n = 13$) zeigte blasse Schleimhäute. Mit 25,9 % ($n = 7$) stellten Bewegungsstörungen, die sich in der Regel in rezidivierenden Lahmheiten äußerten, ein weiteres häufiges Symptom dar. Über ein Fünftel der Tiere (22,2 % oder $n = 6$) war durch einen Gewichtsverlust (Abbildung 8 und 9) auffällig.

Abbildung 8: Deutliche Abmagerung, diffuse Alopezie und Onychogrypose (Patient Nr. 10)



Abbildung 9: Trotz Berücksichtigung des rassetypischen Exterieurs zeigt dieser Hund deutliche Anzeichen der Abmagerung (Patient Nr. 15)



4.2.2 Klinische Symptomatik nach Therapie

Die Tabellen 16, 17 und 18 geben einen Überblick über die Beeinflussung der klinischen Symptomatik durch die Therapie mit Ol-PC. Hierbei wird in Bezug auf die einzelnen Krankheitsanzeichen dokumentiert, bei wie vielen Tieren einer Gruppe eine Besserung oder eine Verschlechterung der klinischen Symptomatik eintrat bzw. bei wie vielen Patienten die Symptomatik nach der Therapie unverändert vorlag. Da die Patienten in der Regel unter mehreren Symptomen litten, ist die Summe der Symptome deutlich höher als die Patientenzahl einer Gruppe.

Tabelle 16: Klinische Veränderungen nach der Therapie mit Ol-PC (Vorversuch)

Symptom	n =	besser	unverändert	schlechter
Hautveränderungen	1	1	0	0
generalisierte Lymphknotenvergrößerung	1	1	0	0
Diarrhoe	1	1*	0	0
blasse Schleimhäute	2	1	1	0
Epistaxis	1	1	0	0
insgesamt	6	5	1	0

* In einer Kotuntersuchung wurde Clostridium perfringens +++ nachgewiesen

Tabelle 17: Klinische Veränderungen nach der Therapie mit Ol-PC (Gruppe A)

Symptom	n =	besser	unverändert	schlechter
Hautveränderungen	9	8	1	0
generalisierte Lymphknotenvergrößerung	5	4	1	0
Anorexie	1	1	0	0
Niereninsuffizienz*	2	1	1	0
Lahmheiten	4	2	2	0
blasse Schleimhäute	7	4	3	0
Gewichtsverlust	5	2	2	1
Lethargie	9	9	0	0
Fieber	1	1	0	0
Epistaxis	3	3	0	0
insgesamt	46	35	10	1

* Die Patienten mit Niereninsuffizienz wurden gleichzeitig einer Infusionstherapie unterzogen

Tabelle 18: Klinische Veränderungen nach der Therapie mit Ol-PC (Gruppe B)

Symptom	n =	besser	unverändert	schlechter
Hautveränderungen	9	8	1	0
generalisierte Lymphknotenvergrößerung*	2	2	0	0
Anorexie	1	0	1	0
Niereninsuffizienz**	1	0	1	0
Lahmheiten	3	1	1	1
blasse Schleimhäute	3	2	1	0
Gewichtsverlust	1	0	1	0
Lethargie	8	6	1	1
Fieber	1	1	0	0
Epistaxis	1	1	0	0
insgesamt	30	21	7	2

* Da 7 Tiere mit Lymphknotenvergrößerung nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurden, konnte das Symptom nur bei 2 Patienten ausgewertet werden

** Der Patient mit Niereninsuffizienz wurde gleichzeitig einer Infusionstherapie unterzogen

Bei der statistischen Auswertung der Befunde mittels McNemar-Test konnte eine signifikante Besserung einiger klinischer Symptome in den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Das Ergebnis wird in Tabelle 19 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 19: Signifikanzen für die Besserung der klinischen Symptomatik innerhalb der verschiedenen Patientengruppen

Symptom	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B
Hautveränderungen		s. (p = 0,004)	s. (p = 0,004)
Lethargie		s. (p = 0,011)	s. (p = 0,016)
blasse Schleimhäute		n.s. (p = 0,063)	
generalisierte Lymphknotenvergrößerung		n.s. (p = 0,188)	
Gewichtsverlust		n.s. (p = 0,250)	
Gesamtheit der Symptome	n.s. (p = 0,109)	s. (p = 0,000)	s. (p = 0,000)

Das am häufigsten diagnostizierte klinische Symptom stellten Veränderungen der Haut dar. In Gruppe A und Gruppe B wurde dieses Symptom bei jeweils 75,0 % (n = 9) der Patienten vor Beginn der Therapie festgestellt. In jeder Patientengruppe war bei 88,9 % (n = 8) der Tiere mit Hautveränderungen eine Besserung des Symptoms zu verzeichnen. Diese Veränderung ist mit $p = 0,004$ als signifikant zu bewerten.

Nach den Hautveränderungen stellte eine Lethargie das zweithäufigste Symptom bei den Patienten dar. Dieses war in Gruppe A bei 75,0 % (n = 9) und in Gruppe B bei 66,7 % (n = 8) der Patienten zu beobachten. In beiden Gruppen besserte sich die klinische Symptomatik mit $p = 0,011$ bzw. $p = 0,016$ signifikant.

Obwohl Lymphknotenvergrößerung bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten in beiden Patientengruppen auftraten, konnte dieses Symptom nur in Gruppe A ausgewertet werden, da in Gruppe B zu wenige Patienten zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurden. Diese Veränderung ist in Gruppe A mit $p = 0,188$ nicht signifikant.

In ähnlicher Weise verhält es sich mit den Krankheitsanzeichen der blassen Schleimhäute und des Gewichtsverlustes. Nur die Gruppe A wies eine ausreichende Anzahl von Patienten diese

Symptome auf. In beiden Fällen konnte mit $p = 0,063$ bzw. $p = 0,250$ keine signifikante Besserung nachgewiesen werden.

Auffallend ist mit $p = 0,000$ eine signifikante Besserung der Gesamtheit der klinischen Symptome in beiden Gruppen. Da sich auch im Vorversuch die Summe aller Symptome als statistisch auswertbar erwies, wurde hier ebenfalls die Signifikanz überprüft. Die Veränderungen waren im Vorversuch mit $p = 0,109$ jedoch nicht signifikant.

Symptome, die weniger als 5 mal innerhalb einer Gruppe zu verzeichnen waren, gingen nicht in die statistische Auswertung ein. Um trotz allem Hinweise auf eine mögliche signifikante Beeinflussung dieser Krankheitsanzeichen durch die Therapie zu erhalten, wurden alle Befunde zusätzlich auch gruppenübergreifend ausgewertet. Diese Ergebnisse sind allerdings nur eingeschränkt beurteilbar, da die unterschiedlichen Dosierungen und Injektionszeitpunkte unberücksichtigt bleiben. Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der gruppenübergreifenden Auswertung. Hier fanden sich mit $p = 0,000$ signifikante Besserungen der Symptome „Hautveränderungen“ und „Lethargie“. Die Krankheitsanzeichen „generalisierte Lymphknotenvergrößerungen“ und „blasse Schleimhäute“ besserten sich mit $p = 0,008$ signifikant. Mit $p = 0,031$ konnte eine signifikante Besserung des Symptoms „Epistaxis“ verzeichnet werden. Die Veränderungen von „Gewichtsverlust“ ($p = 0,250$) und „Lahmheiten“ ($p = 0,313$) waren nicht signifikant. Die Gesamtheit aller Symptome zeigte mit $p = 0,000$ eine signifikante Besserung.

Tabelle 20: Signifikanzen für die Besserung der klinischen Symptomatik (gruppenübergreifend)

Symptom	Signifikanz
Hautveränderungen	s. ($p = 0,000$)
Lethargie	s. ($p = 0,000$)
generalisierte Lymphknotenvergrößerung	s. ($p = 0,008$)
blasse Schleimhäute	s. ($p = 0,008$)
Epistaxis	s. ($p = 0,031$)
Gewichtsverlust	n.s. ($p = 0,250$)
Lahmheiten	n.s. ($p = 0,313$)
Gesamtheit der Symptome	s. ($p = 0,000$)

4 Patienten (das entspricht 14,8 %) sprachen nicht auf die Therapie mit Ol-PC an.

Die Abbildungen 10 bis 17 dokumentieren die Entwicklung der Symptomatik bei Patient Nr. 13 vor und unmittelbar nach der Therapie sowie zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung 6 Wochen nach Beendigung der Behandlung mit Ol-PC.

Abbildung 10:

Patient Nr. 13 vor der Therapie mit Ol-PC: Hochgradige Ulzera an den Ohrrändern, exfoliative Dermatitis, „Brillenbildung“

**Abbildung 11:**

Patient Nr. 13 vor der Therapie mit Ol-PC: Neben hochgradigen Ulzera an den Ohrrändern sind eine exfoliative Dermatitis und eine diffuse Alopezie vor allem im Bereich der Ohren, der Schläfen und periorbital zu erkennen.



Die Besitzer berichten von einem deutlichen Leistungsabfall des Tieres. Das Gewicht beträgt zu diesem Zeitpunkt 11,5 kg.

Abbildung 12:

Patient Nr.13 vor der Therapie mit Ol-PC: Hochgradige Ulzera an den Ohrrändern und der rechten, vorderen Gliedmaße, exfoliative Dermatitis und diffuse Alopezie im Bereich des Kopfes und der Gliedmaßen

**Abbildung 13:**

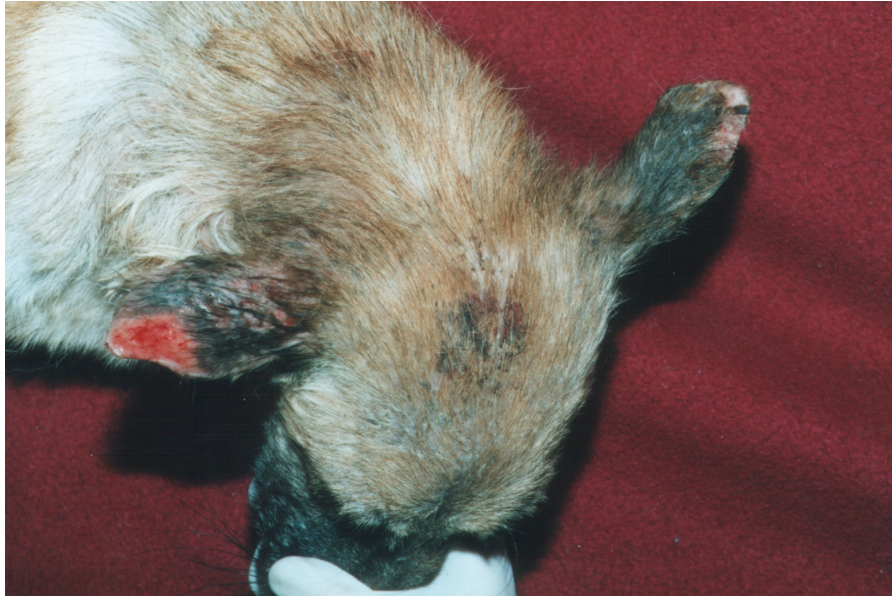
Patient Nr.13 vor der Therapie mit Ol-PC: Ulzera, exfoliative Dermatitis und diffuse Alopezie an der rechten Vordergliedmaße, Onychogrypose



Neben der Verabreichung von Ol-PC erhielt der Hund als therapiebegleitende Maßnahme einen Kopfverband um eine anhaltende Traumatisierung der Ohrränder durch häufiges Kopfschütteln zu vermeiden.

Abbildung 14:

Patient Nr. 13 unmittelbar nach der Therapie mit Ol-PC: Die ulzerativen Veränderungen zeigen eine beginnende Bildung von Granulationsgewebe. Im Bereich der Schläfen sind ein dünnes Haarkleid und Schuppenbildung weiterhin deutlich zu erkennen.

**Abbildung 15:**

Patient Nr. 13 unmittelbar nach der Therapie mit Ol-PC: Abheilung der Ulzera an den Ohrrändern, exfoliative Dermatitis, „Brillenbildung“.



Der Patient weist am Ende der Therapie ein gutes Allgemeinbefinden und ein Gewicht von 11,0 kg auf.

Die Besitzer berichteten über ein vollständiges Abheilen der Ohrtrandveränderungen innerhalb von 2 bis 3 Wochen nach Beendigung der Therapie. Diese begannen sich jedoch nach ca. 14 Tagen erneut zu verschlechtern. Das Tier zeigte eine deutliche Leistungssteigerung und eine Gewichtszunahme auf 14,0 kg.

Abbildung 16:

Patient Nr. 13 zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung (6 Wochen nach Therapieende): Obwohl sich an den Ohrträgern erneut ulzerative Veränderungen zu bilden beginnen, weist das Tier zu diesem Zeitpunkt ein dichtes Haarkleid und eine intakte Haut auf.



Abbildung 17:

Patient Nr. 13 zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung (6 Wochen nach Therapieende): Die ulzerativen Veränderungen im Bereich der rechten Vorderpfote sind vollständig abgeheilt. Das Haarkleid ist geschlossen.



4.2.3 Remissionszeit

In Tabelle 21 werden die Remissionszeiten für die Patientengruppen A und B zusammenfassend dargestellt. Auf Grund der geringen Patientenzahl im Vorversuch gingen die Werte dieser Gruppe nicht in die Auswertung ein.

Tabelle 21: Remissionszeiten der behandelten Patienten

	Gruppe A	Gruppe B
Zeitspanne, in der ein Rezidiv bei 25 % der Patienten auftrat	1 Woche	1 Woche
Zeitspanne, in der ein Rezidiv bei 50 % der Patienten auftrat (mediane Remissionszeit)	4 Wochen	7 Wochen
Zeitspanne, in der ein Rezidiv bei 75 % der Patienten auftrat	17 Wochen	31 Wochen

Aus der Tabelle geht hervor, dass in beiden Gruppen bereits nach 1 Woche ein Rezidiv bei 25 % der Patienten vorlag. Die mediane Remissionszeit betrug in Gruppe A 4 Wochen und in der Gruppe B 7 Wochen. Die Zeitspanne, in der in Gruppe A 75 % der Patienten rezidierten betrug mit 17 Wochen annähernd die Hälfte im Vergleich zur Gruppe B, in der 75 % der Patienten erst nach etwa 31 Wochen erneut eine deutliche Symptomatik zeigten. Die Unterschiede der Remissionszeiten in den Patientengruppen A und B wurden mittels Mantel-Cox-Test bezüglich ihrer Signifikanz überprüft. Diese sind mit $p = 0,649$ nicht signifikant. Die Einzeltierbefunde sind in der Tabelle 30 des Anhangs dargestellt.

4.3 Nebenwirkungen

In diesem Abschnitt sollen die im Rahmen der Behandlung aufgetretenen Nebenwirkungen hinsichtlich ihrer Art und ihres Schweregrades aufgeführt werden. Die Häufigkeit und die Intensität der Nebenwirkungen in den einzelnen Behandlungsgruppen wird miteinander

verglichen. Hierzu wurden die mittels Scoring-System erstellten Zahlenwerte, die die Intensität der einzelnen Nebenwirkungen widerspiegeln, mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Behandlungsgruppen A und B überprüft. Auf Grund zu geringer Patientenzahlen konnten die Tiere des Vorversuchs nicht mit in den Gruppenvergleich einbezogen werden.

88,9 % (n = 24) aller behandelten Tiere wiesen während der Therapie zeitweilig gastrointestinale Symptome auf. Hierbei zeigte etwa die Hälfte der Patienten eine reduzierte Futteraufnahme (n = 14 oder 51,9 %), die sich bei 25,9 % (n = 7) aller Patienten in Form einer Anorexie äußerte. Über die Hälfte aller Patienten setzte breiigen Kot ab (n = 15 oder 55,6 %). Bei 33,3 % (n = 9) der behandelten Hunde war Vomituz zu verzeichnen. In Einzelfällen (n = 3 bzw. 11,1 %) wurde wässriger oder blutig-wässriger Kotabsatz beobachtet. Jedoch konnte weder in der Häufigkeit noch in der Stärke der Nebenwirkungen mit $p = 0,642$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen A und B nachgewiesen werden. Die prozentuale Verteilung gastrointestinaler Symptome ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Prozentuale Häufigkeit gastrointestinaler Symptome in den einzelnen Behandlungsgruppen (n=27)

Patienten- gruppe	reduzierte Futteraufnahme	Anorexie	Vomituz	breiiger Kotabsatz	wässriger bzw. wässrig-blutiger Kotabsatz
Vorversuch	2 (7,4 %)	1 (3,7 %)	0	2 (7,4 %)	0
Gruppe A	8 (29,6 %)	3 (11,1 %)	4 (14,8 %)	7 (25,9 %)	1 (3,7 %)
Gruppe B	4 (14,8 %)	3 (11,1 %)	5 (18,5 %)	6 (22,2 %)	2 (7,4 %)
insgesamt	14 (51,9 %)	7 (25,9 %)	9 (33,3 %)	15 (55,6 %)	3 (11,1 %)

Schwellungen der Injektionsstellen konnten bei 81,5 % (n = 22) der Patienten nachgewiesen werden. Geringgradige (ggr.) Schwellungen traten bei 11,1 % (n = 3) aller behandelten Hunde auf. Dagegen konnten mittelgradige (mgr.) Schwellungen bei fast der Hälfte der Patienten nachgewiesen werden (n = 13 oder 48,1 %). Hochgradige (hgr.) Schwellungen waren bei insgesamt 22,2 % (n = 6) der Tiere zu verzeichnen. Die Hälfte der Patienten, die hochgradige

Schwellungen aufwies ($n = 3$ oder 11,1 %), zeigte auch eine vermehrte Wärme und Schmerzhaftigkeit im Bereich der Injektionsstelle. Signifikante Unterschiede in der Häufigkeit oder dem Grad der Schwellungen zwischen Gruppe A und Gruppe B lagen mit $p = 0,212$ nicht vor. Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die prozentuale Häufigkeit von Schwellungen der Injektionsstellen und deren Schweregrad in den verschiedenen Gruppen.

Tabelle 23: Prozentuale Häufigkeit von Schwellungen der Injektionsstellen in den einzelnen Behandlungsgruppen ($n = 27$)

Patienten- gruppe	ggr. Schwellungen	mgr. Schwellungen	hgr. Schwellungen (nicht vermehrt warm oder schmerzhaft)	hgr. Schwellungen (vermehrt warm und schmerzhaft)
Vorversuch	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	0
Gruppe A	2 (7,4 %)	4 (14,8 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)
Gruppe B	0	8 (29,6 %)	1 (3,7 %)	2 (7,4 %)
insgesamt	3 (11,1 %)	13 (48,1 %)	3 (11,1 %)	3 (11,1 %)

Ein weiteres Symptom, welches bei der Mehrheit der Tiere (74,1 % oder $n = 20$) auftrat, stellte eine erhöhte Körpertemperatur ($> 39,0^{\circ}\text{C} - 39,5^{\circ}\text{C}$) bzw. Fieber ($> 39,5^{\circ}\text{C}$) dar. 55,6 % ($n = 15$) der behandelten Tiere zeigten eine Erhöhung der Körpertemperatur auf bis zu $39,5^{\circ}\text{C}$. 18,5 % ($n = 5$) der Hunde wiesen während der Behandlung zeitweilig Temperaturen über $39,5^{\circ}\text{C}$ auf. Die Gruppenunterschiede zwischen den Patienten der Gruppe A und Patienten der Gruppe B waren mit $p = 0,026$ signifikant. Patienten der Gruppe B zeigten in diesem Zusammenhang eine deutlichere Ausprägung dieser Nebenwirkung als Tiere der Gruppe A. Die prozentuale Häufigkeit einer erhöhten Körpertemperatur bzw. Fieber ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Prozentuale Häufigkeit erhöhter Körpertemperaturen bzw. Fieber in den einzelnen Behandlungsgruppen (n = 27)

Patientengruppe	erhöhte Körpertemperatur (> 39,0° C – 39,5° C)	Fieber (> 39,5° C)
Vorversuch	2 (7,4 %)	0
Gruppe A	6 (22,2 %)	1 (3,7 %)
Gruppe B	7 (25,9 %)	4 (14,8 %)
insgesamt	15 (55,6 %)	5 (18,5 %)

Bei keinem Patient musste die Therapie auf Grund von Nebenwirkungen vorzeitig abgebrochen werden.

4.4 Labordiagnostische Veränderungen

4.4.1 Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie

Bei 25 von 27 Patienten (das entspricht 92,6 %) konnte vor Behandlungsbeginn eine Hyperglobulinämie nachgewiesen werden. Diese Veränderung spiegelte sich allerdings nur bei 40,7 % (n = 11) der Hunde in einem erhöhten Gesamtprotein wieder. 59,3 % (n = 16) der Tiere zeigten eine Hypoalbuminämie. Eine Anämie war zu diesem Zeitpunkt bei 74,1 % (n = 20) der Patienten zu verzeichnen. Fast ein Drittel der Tiere (n = 8 oder 29,6 %) wies eine Leukozytopenie auf. Über ein Viertel der Tiere (n = 7 oder 25,9 %) zeigte eine Thrombozytopenie. Eine Leukozytose trat bei 11,1 % (n = 3) der Patienten auf. Die bei leishmaniosekranken Patienten häufig auftretenden Erhöhungen der Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Blutplasma wurden bei 11,1 % (n = 3) der Hunde vor der Therapie nachgewiesen. Bei keinem Tier wurden erhöhte Aktivitäten der Leberenzyme GPT, AP und GLDH im Blutplasma beobachtet. Bei über einem Drittel der Patienten (n = 10 bzw. 37,0 %) konnte vor dem Beginn der Behandlung ein erhöhter Protein-Kreatinin-Quotient im Urin nachgewiesen werden.

Tabelle 25 gibt die prozentuale Häufigkeit charakteristischer Veränderungen im Blutbild und im Urin in den verschiedenen Behandlungsgruppen an. Die labordiagnostischen Befunde der einzelnen Patienten sind in Tabelle 30 des Anhangs aufgeführt.

Tabelle 25: Labordiagnostische Veränderungen vor der Therapie mit Ol-PC

	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	insgesamt
Anämie	2 (7,4 %)	10 (37,0 %)	8 (29,6 %)	20 (74,1 %)
Leukozytopenie	0	5 (18,5 %)	3 (11,1 %)	8 (29,6 %)
Leukozytose	0	1 (3,7 %)	2 (7,4 %)	3 (11,1 %)
Thrombozytopenie	2 (7,4 %)	4 (14,8 %)	1 (3,7 %)	7 (25,9 %)
Azotämie	0	2 (7,4 %)	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)
Hyperproteinämie	1 (3,7 %)	2 (7,4 %)	8 (29,6 %)	11 (40,7 %)
Hyperglobulinämie	2 (7,4 %)	12 (44,4 %)	11 (40,7 %)	25 (92,6 %)
Hypoalbuminämie	1 (3,7 %)	10 (37,0 %)	5 (18,5 %)	16 (59,3 %)
Erhöhte Leberenzym- aktivitäten	0	0	0	0
erhöhter Protein- Kreatinin-Quotient (Urin)	2 (7,4 %)	6 (22,2 %)	6 (22,2 %)	10 (37,0 %)

4.4.2 Labordiagnostische Veränderungen nach Therapie

Labordiagnostische Parameter wurden vor, während und unmittelbar nach der Therapie sowie 6 Wochen nach Beendigung der Therapie erhoben. Obwohl der Vorversuch nur eine geringe Patientenzahl ($n = 3$) umfasst, werden zunächst einige auffällige hämatologische Veränderungen dieser Behandlungsgruppe dargestellt, welche mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ bezüglich ihrer Signifikanz überprüft wurden. Weiterhin sollte vor allem die Beeinflussung labordiagnostischer Werte durch die Therapie mit Ol-PC in den Behandlungsgruppen A und B statistisch ausgewertet werden. Zur Erfassung signifikanter Veränderungen wurde in diesem Zusammenhang eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ und der sich anschließende Wald-Test durchgeführt. Hierbei sollten nach Überprüfung eines möglichen Gruppenunterschiedes sowohl signifikante Zeiteffekte als auch signifikante Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeit erfasst werden. Die statistische Auswertung

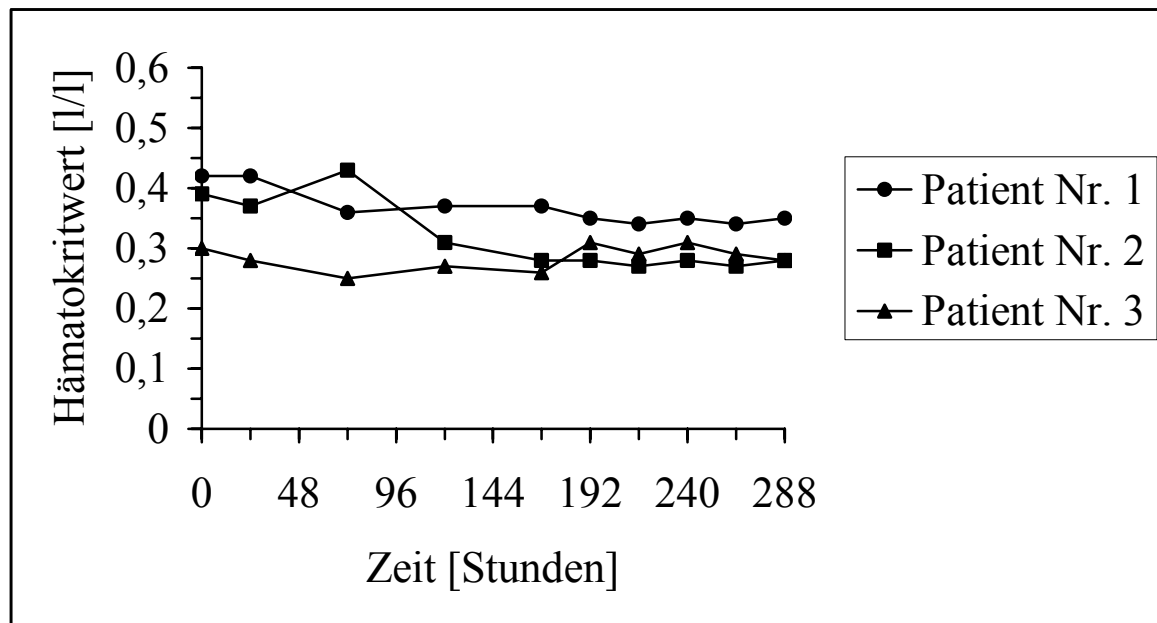
umfasste zum einen den Zeitraum von Therapiebeginn bis zur Kontrolluntersuchung 6 Wochen nach der Entlassung (Tag 0 – 56). Gesondert hiervon wurden die Daten von Therapiebeginn bis zum Therapieende bezüglich signifikanter Veränderungen überprüft (Tag 0 – 14).

4.4.2.1 Vorversuch

Die Betrachtung hämatologischer Parameter bei den Patienten des Vorversuchs wies über den Zeitraum der Behandlung auffällige Veränderungen des Hämatokritwertes, der Gesamtleukozytenzahl und der Thrombozytenzahl auf. Ferner konnten Veränderungen der sogenannten „mean platelet component concentration“ (MPC) – ein Maß für die Granularität von Thrombozyten - und der sogenannten „platelet component distribution width“ (PCDW) – ein Maß für die Variation in der Granularität der Blutplättchen - festgestellt werden.

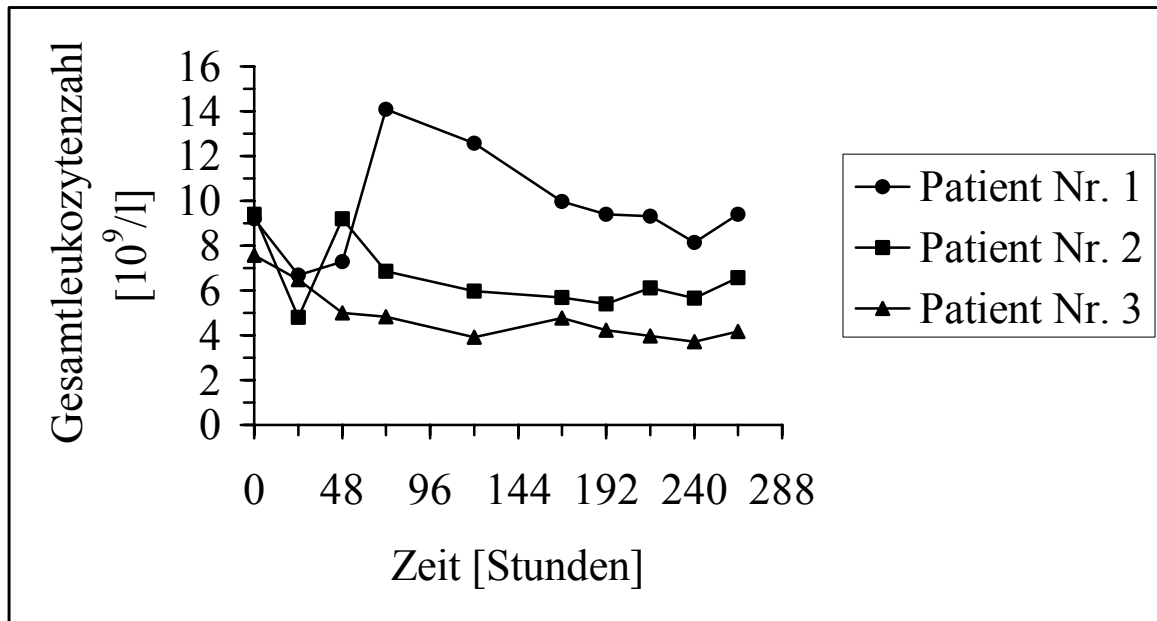
2 Patienten (Hund Nr. 1 und Nr. 2) zeigten unter Therapie mit Ol-PC eine deutliche Abnahme des Hämatokritwertes. Bei Patient Nr. 1 sank in diesem Zusammenhang der Hämatokritwert um insgesamt 0,08 l/l, während bei Patient Nr. 2 der Wert sogar um 0,12 l/l abnahm. Diese Veränderung konnte bei Patient Nr. 3 nur eingeschränkt beobachtet werden. Der Hämatokritwert fiel zwar auch hier innerhalb der ersten 48 Stunden nach der ersten Injektion um 0,05 l/l, stieg dann aber erneut an. Die Werte von Patient Nr. 1 und Nr. 2 blieben im weiteren Verlauf zunächst niedrig. Abbildung 18 zeigt den Verlauf der Werte bei den einzelnen Patienten.

Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf des Hämatokritwertes bei den Patienten des Vorversuchs während der Therapie



Ferner war innerhalb von 48 Stunden nach der ersten Injektion bei allen Patienten ein deutlicher Abfall der Gesamtleukozytenzahl zu beobachten. Bei 2 Patienten (Patient Nr. 2 und Nr. 3) sanken die Werte sogar unter den Referenzbereich. Während die Werte bei Patient Nr. 3 auf diesem Niveau im weiteren Verlauf der Therapie schwankten, stiegen sie bei Patient Nr. 1 und Nr. 2 zunächst wieder an, um dann erneut abzufallen. Abbildung 19 gibt Auskunft über die Gesamtleukozytenzahlen im Verlauf der Behandlung.

Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Gesamtleukozytenzahl bei den Patienten des Vorversuchs während der Therapie



Die Abbildungen 20, 21 und 22 stellen den Verlauf der Thrombozytenzahlen, der MPC und der PCDW dar. Die Patienten Nr. 1 und Nr. 2 wurden zu Behandlungsbeginn mit einer Thrombozytopenie vorgestellt. Ihre Werte stiegen unter der Therapie kontinuierlich an. Bei Patient Nr. 3 sanken die Werte zwar ab, blieben aber über die gesamte Zeit im Referenzbereich. Außerdem wurde bei allen Patienten über den Zeitraum, in dem die Tiere Injektionen erhielten, ein Abfall der MPC beobachtet. Parallel zum Abfall der MPC trat ein Anstieg der PCDW auf.

Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenzahlen bei den Patienten des Vorversuchs während der Therapie

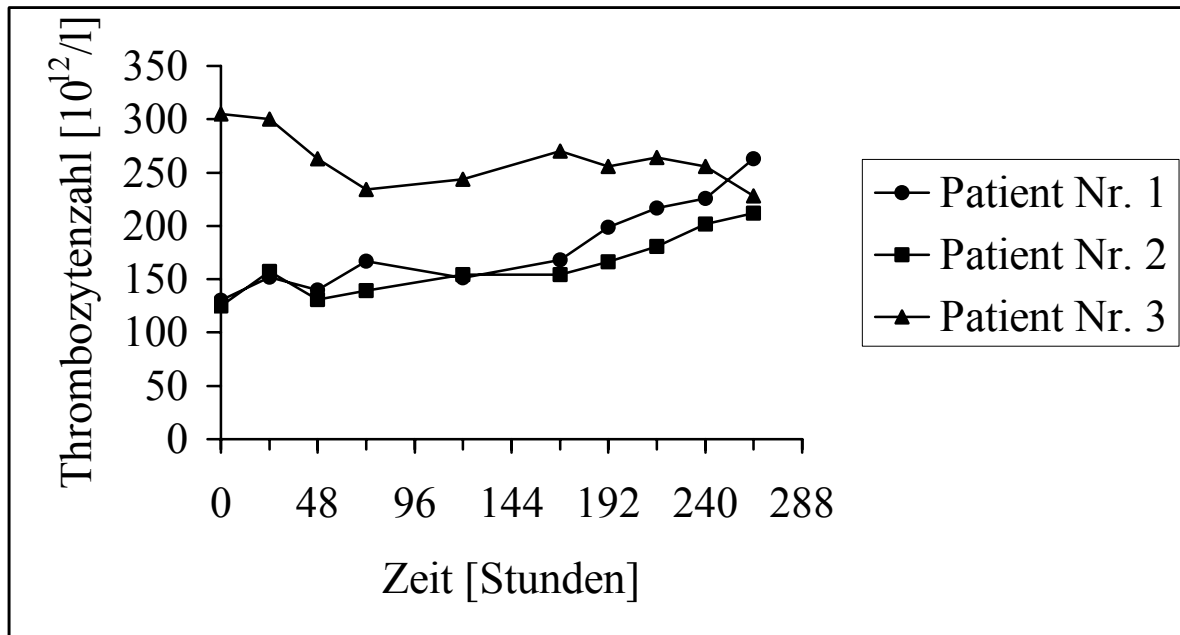


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der MPC bei den Patienten des Vorversuchs während der Therapie

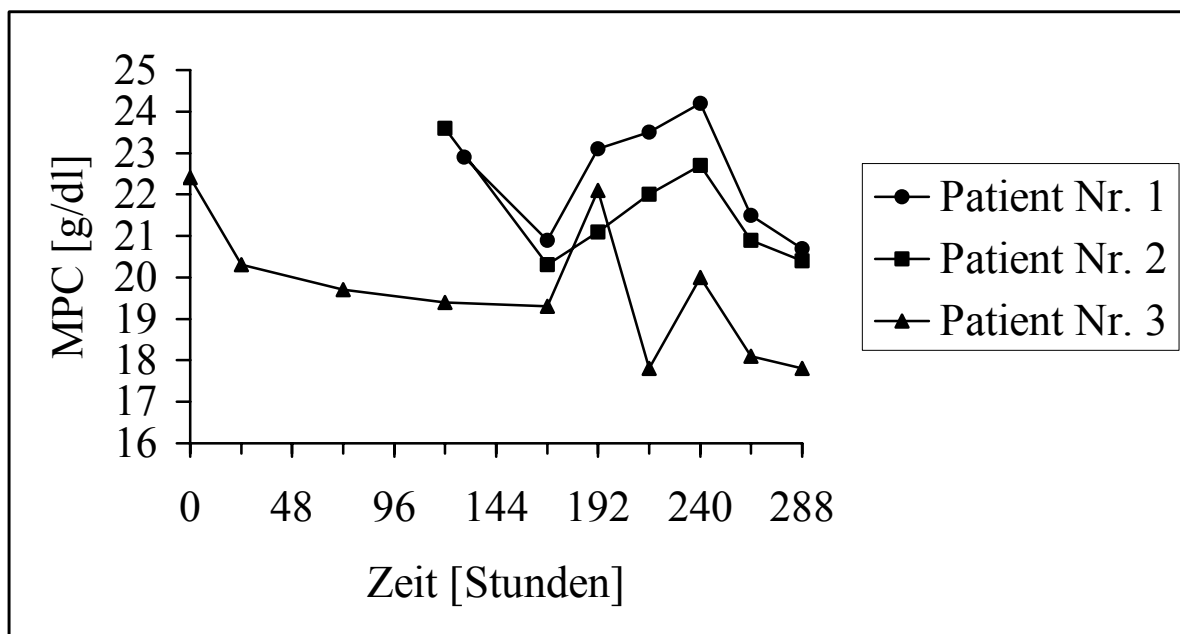
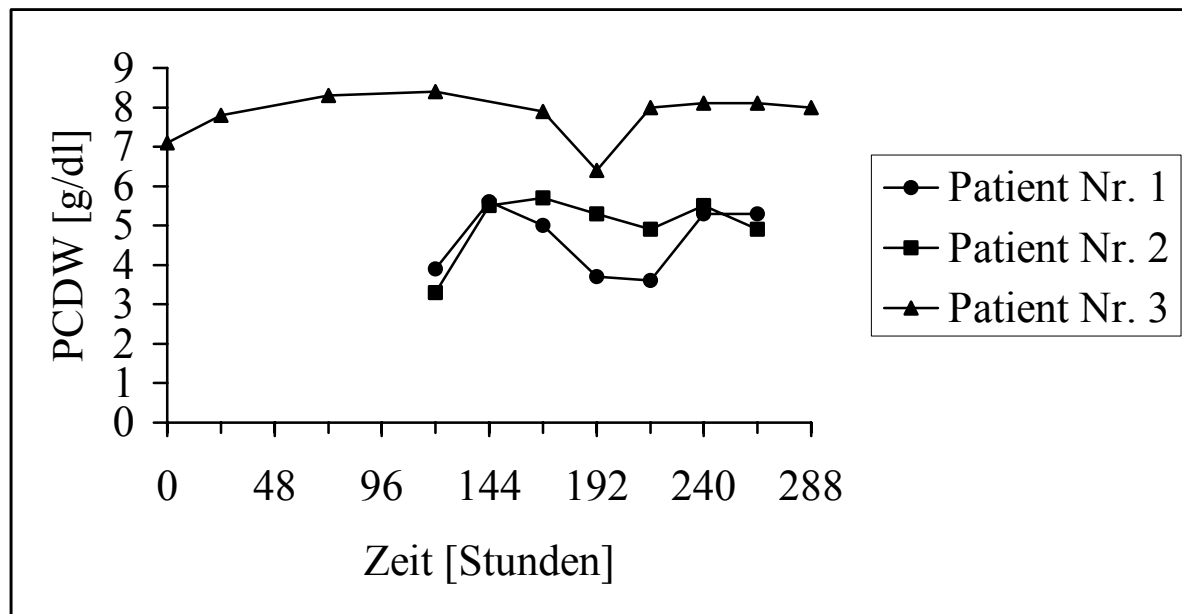


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der PCDW bei den Patienten des Vorversuchs während der Therapie



Mit Ausnahme der MPC ($p = 0,042$) erwiesen sich die übrigen hämatologischen Veränderungen als nicht signifikant.

4.4.2.2 Patientengruppe A und B

Um den Einfluß der Therapie auf die Parameter des roten Blutbildes zu überprüfen, wurde die Entwicklung der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten und des Hämatokritwertes verfolgt. Die Abbildungen 23 bis 25 geben Auskunft über die Entwicklung dieser Werte. Sowohl die Erythrozytenzahl als auch der Hämoglobingehalt der Erythrozyten und der Hämatokritwert stiegen deutlich an. Bereits bei Betrachtung der Abbildungen fällt auf, dass innerhalb der ersten 14 Tage nach Behandlungsbeginn lediglich ein geringgradiger Anstieg der Werte zu verzeichnen war. Der Anstieg der Werte schien sich hauptsächlich im Zeitraum vom Behandlungsende bis zur Kontrolluntersuchung zu vollziehen. Die statistische Auswertung bestätigt diese Beobachtung. Während bis zum 14. Tag keine signifikanten Veränderungen vorlagen, erwiesen sich die Veränderungen vom Behandlungsbeginn bis zur Kontrolluntersuchung mit $p = 0,000$ als signifikant. Neben einem signifikanten Zeiteffekt konnte für die Erythrozytenzahl ($p = 0,002$), den Hämoglobingehalt der Erythrozyten ($p = 0,006$) und den Hämatokritwert ($p = 0,015$) auch eine signifikante Wechselwirkung zwischen Gruppe und Zeit festgestellt werden. Der Anstieg der Werte in Gruppe B schien in diesem Zusammenhang deutlicher zu sein als in Gruppe A. Bei der Interpretation des Befundes muß

jedoch berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung nur 3 Patienten der Gruppe B vorgestellt wurden.

Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Erythrozytenzahl im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B

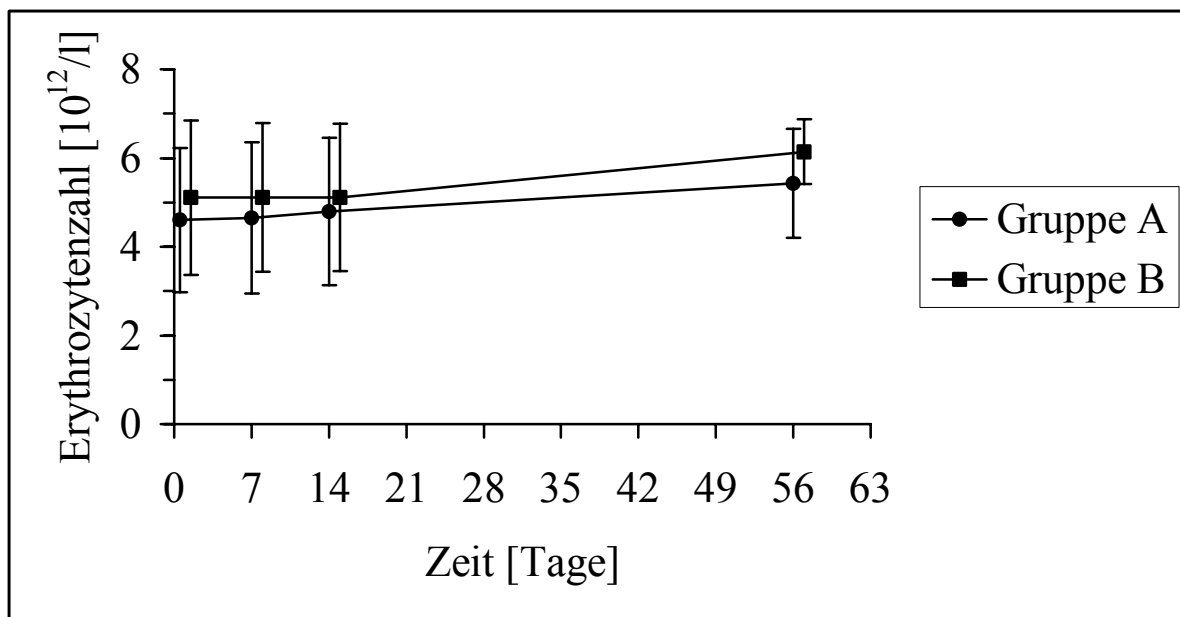


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B

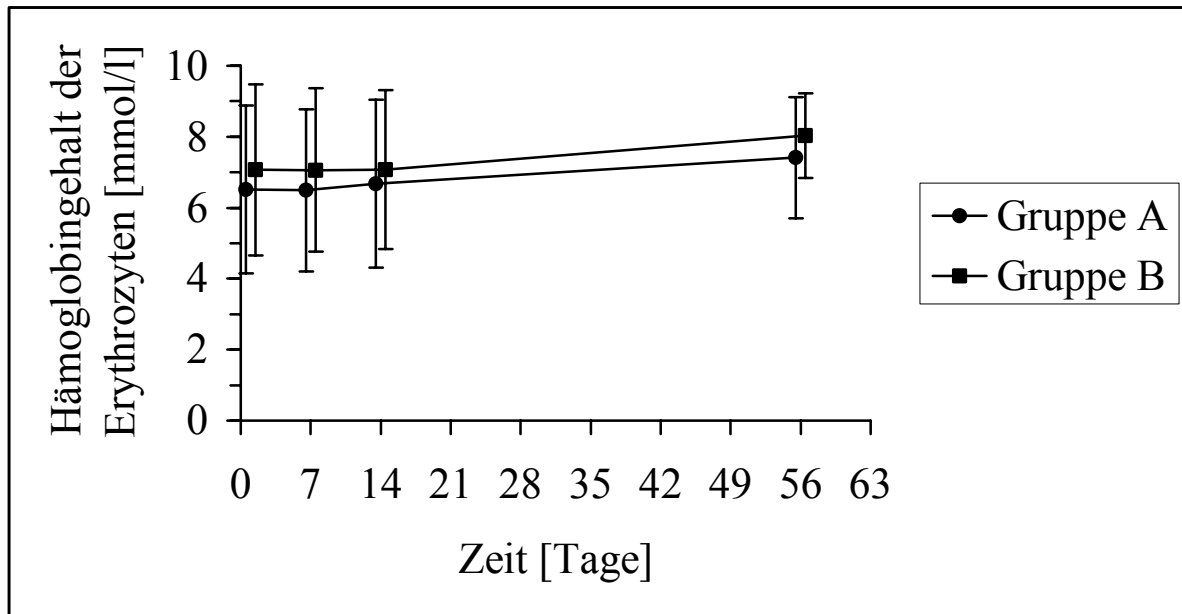
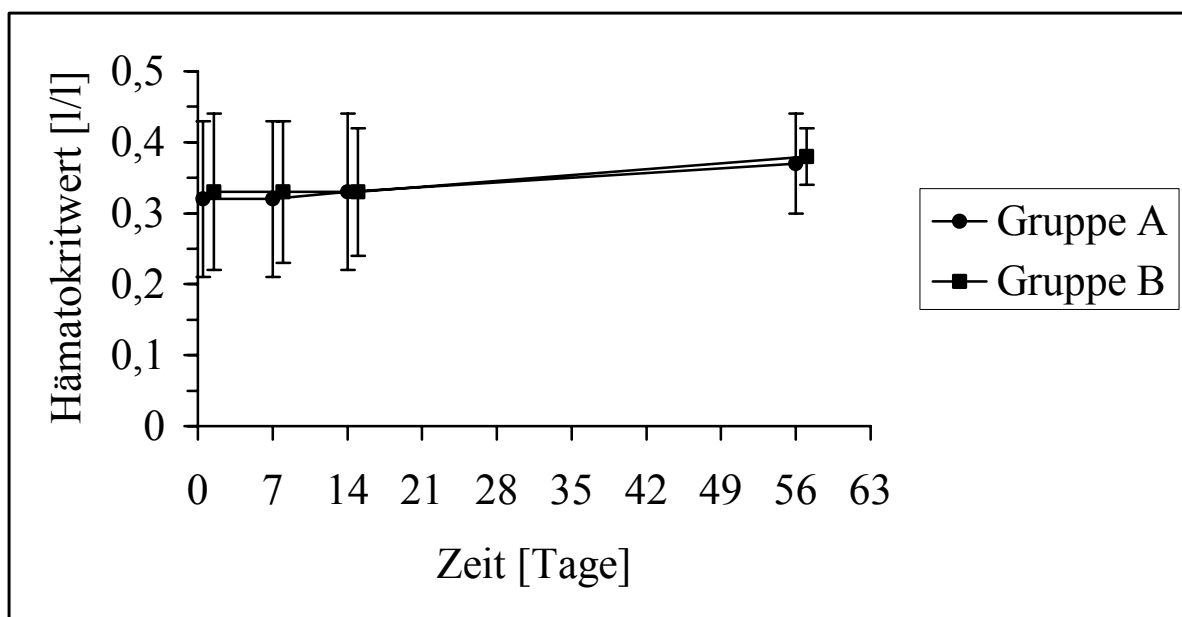
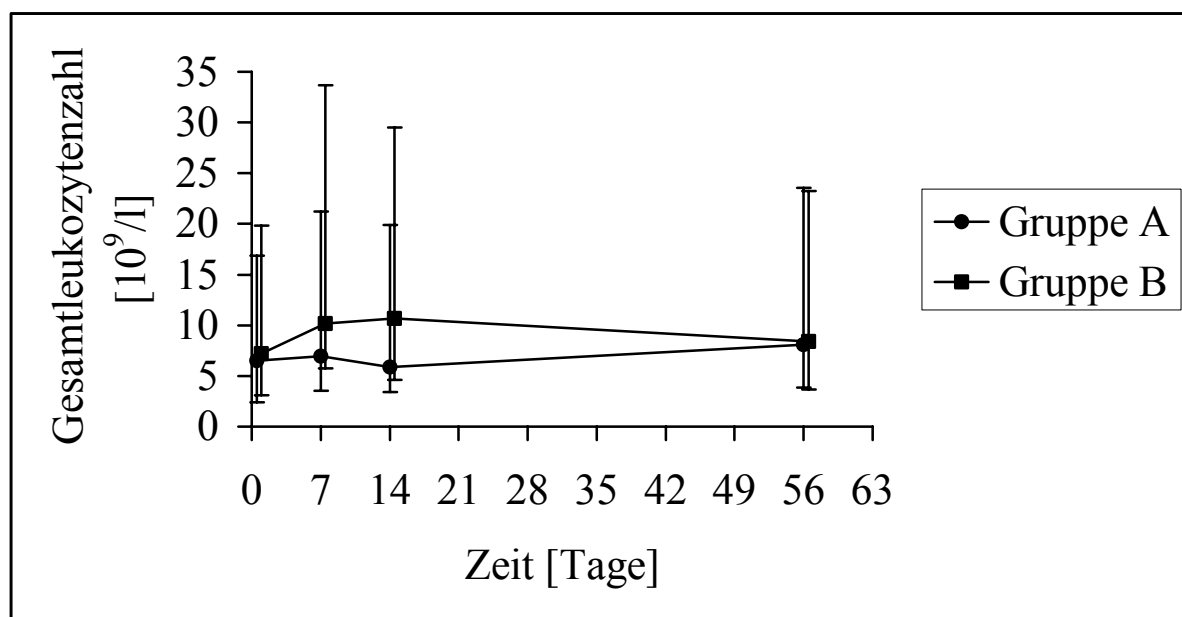


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf des Hämatokritwertes im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B



Auch bei den Parametern des weissen Blutbildes konnten signifikante Veränderungen unter dem Einfluß der Therapie mit Ol-PC verzeichnet werden. Über den Zeitraum von Behandlungsbeginn bis zur Kontrolluntersuchung 6 Wochen nach Beendigung der Therapie stieg die Gesamtleukozytenzahl mit $p = 0,024$ signifikant an. Anhand des Differentialblutbildes spiegelte sich der Anstieg der Gesamtleukozytenzahl in einem signifikanten Anstieg von neutrophilen ($p = 0,049$) und eosinophilen ($p = 0,022$) Granulozyten wieder. Die Veränderungen der Gesamtleukozytenzahl innerhalb der ersten 14 Tage war mit $p = 0,060$ knapp nicht signifikant. Abbildung 26 stellt den zeitlichen Verlauf der Gesamtleukozytenzahl dar.

Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Gesamtleukozytenzahl im geometrischen Mittelwert mit Streufaktor bei den Patientengruppen A und B



Der Verlauf der Thrombozytenzahl ist in Abbildung 27 dargestellt. Anhand der Abbildung lässt sich ein deutlicher Anstieg der Thrombozytenzahl über den gesamten Zeitraum beobachten. Mit Hilfe der statistischen Auswertung erwies sich dieser Anstieg mit $p = 0,000$ als signifikant. Neben der Thrombozytenzahl wurde als Maß für die Aktivierung der Blutplättchen die MPC und die PCDW ausgewertet. Während die MPC keine signifikanten Veränderungen aufwies, trat mit $p = 0,026$ innerhalb der ersten 14 Tage nach Behandlungsbeginn eine signifikante Veränderung der PCDW auf. Nach einem deutlichen initialen Abfall der Werte innerhalb der ersten 7 Behandlungstage stieg die PCDW wieder auf das Ausgangsniveau an. Da zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung nur von einem Patienten

der PCDW-Wert vorliegt, muß dies bei der Interpretation des Befundes berücksichtigt werden. Der Verlauf der Werte ist in Abbildung 28 dargestellt.

Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenzahl im geometrischen Mittelwert mit Streufaktor bei den Patientengruppen A und B

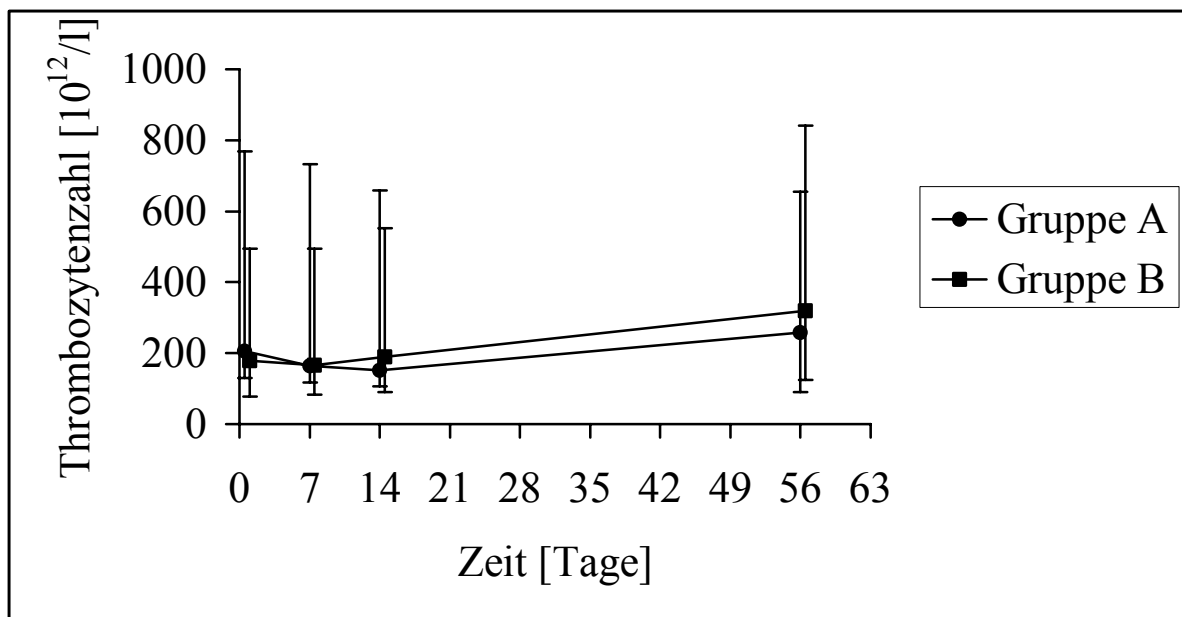
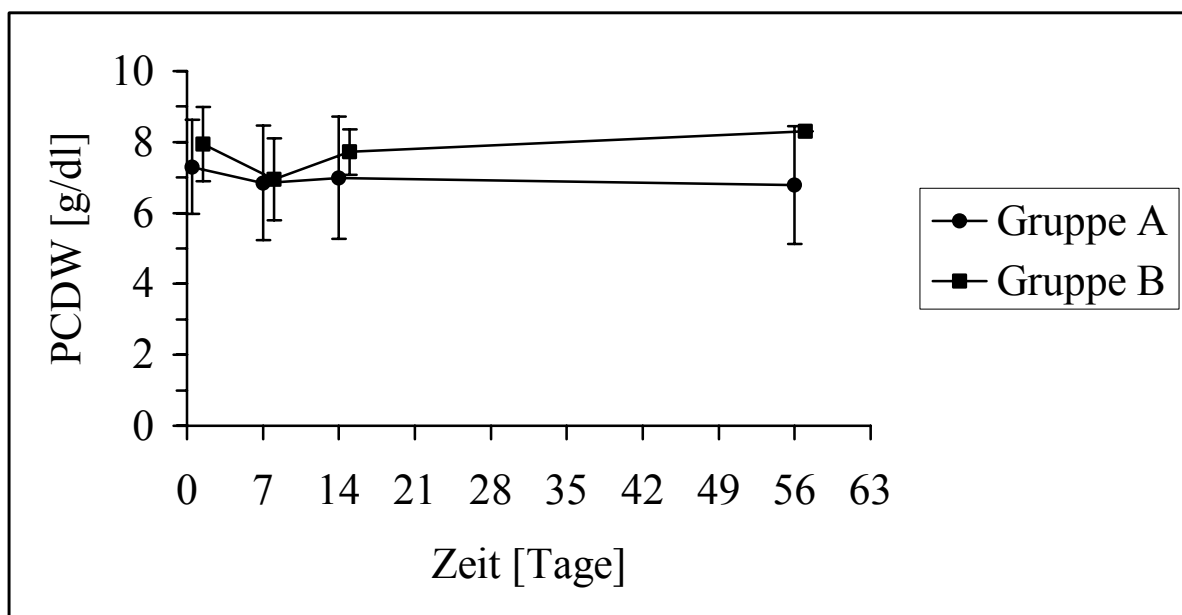


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der PCDW im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B



Als Nierenparameter wurden neben Harnstoff und Kreatinin die Elektrolyte Natrium, Chlorid, Kalium, Kalzium und anorganisches Phosphat ausgewertet. Weder bei Harnstoff noch bei Kreatinin war eine signifikante Veränderung der Werte zu verzeichnen. Dagegen schienen einige Elektrolyte – mit Ausnahme des anorganischen Phosphats - signifikant durch die Therapie beeinflusst worden zu sein. So konnte mit $p = 0,049$ bzw. $p = 0,046$ ein signifikanter Anstieg von Chlorid und Natrium innerhalb der ersten 14 Tage festgestellt werden. Kalzium zeigte mit $p = 0,034$ eine signifikante Wechselwirkung zwischen Gruppe und Zeit innerhalb der ersten 14 Tage der Behandlung. Das Kalium zeigte mit $p = 0,019$ nicht nur eine signifikante Wechselwirkung zwischen Gruppe und Zeit innerhalb der ersten 14 Tage sondern mit $p = 0,030$ auch über den gesamten Beobachtungszeitraum. Während die Werte bei den Patienten der Gruppe A im Durchschnitt anstiegen, blieben die Werte bei den Patienten der Gruppe B unverändert oder sanken ab. Hierbei ist jedoch erneut zu beachten, dass zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung nur 3 Patienten der Gruppe B vorgestellt wurden. Der Verlauf der Elektrolyte wird in den Abbildungen 29 bis 32 zusammengefasst.

Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Chloridkonzentration im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B

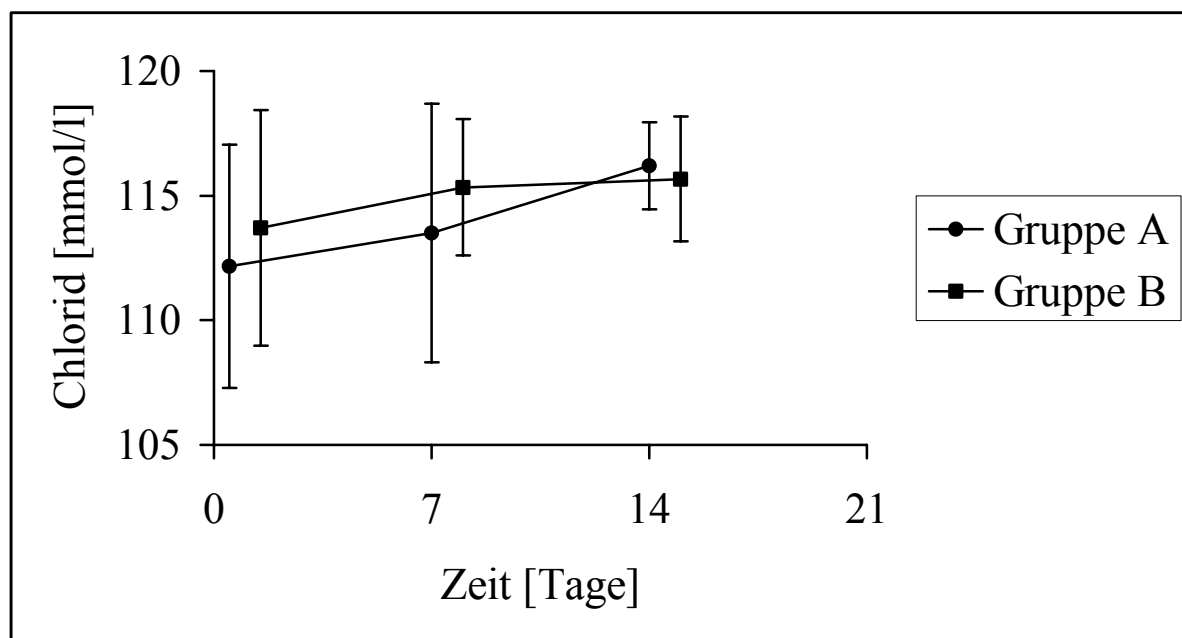


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Natriumkonzentration im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B

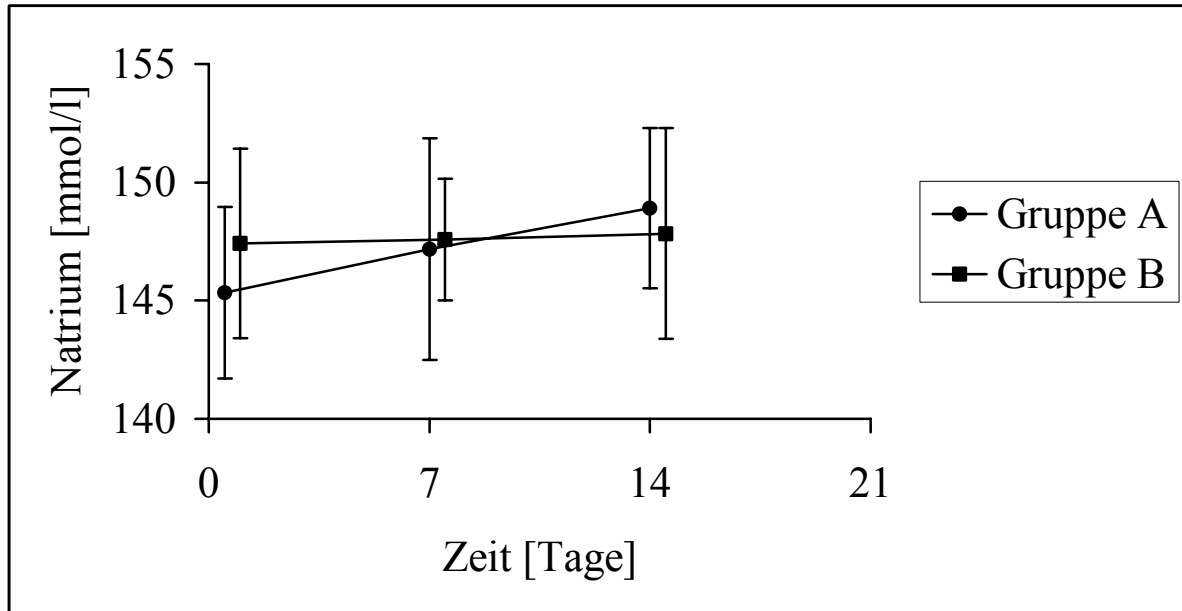


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der Kalziumkonzentration im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B

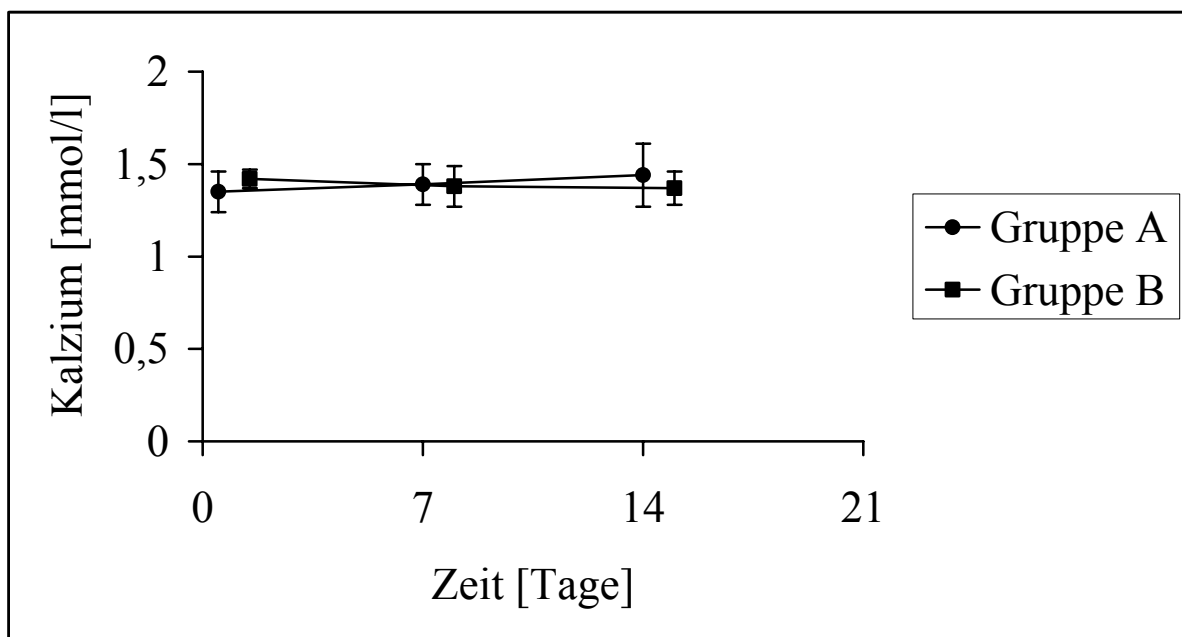
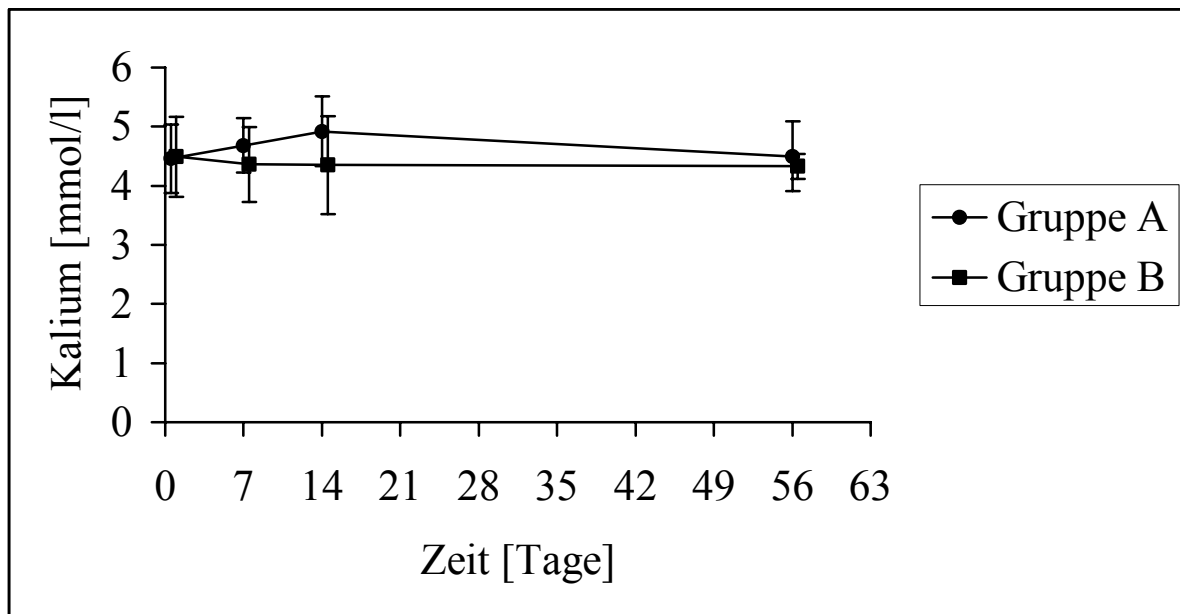
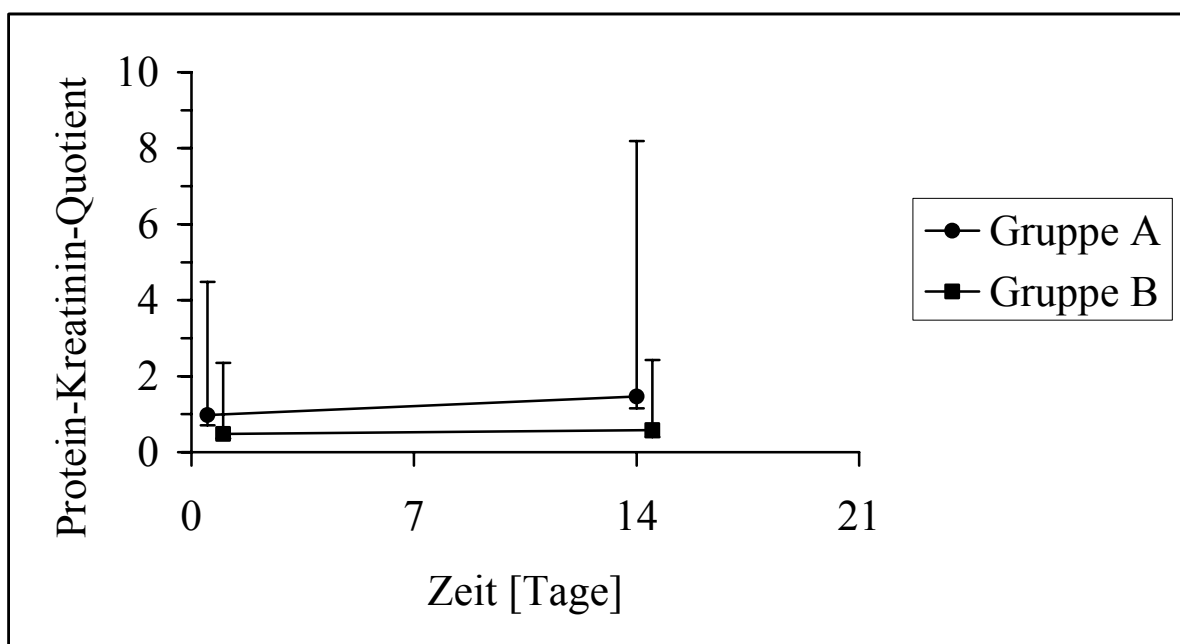


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Kaliumkonzentration im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B



Als Maß für die Proteinausscheidung mit dem Urin wurde der Protein-Kreatinin-Quotient vor Beginn und nach Beendigung der Therapie erhoben. In diesem Zusammenhang konnte mit $p = 0,007$ ein signifikanter Anstieg des Protein-Kreatinin-Quotienten beobachtet werden. Der Verlauf des Protein-Kreatinin-Quotienten wird in Abbildung 33 dargestellt.

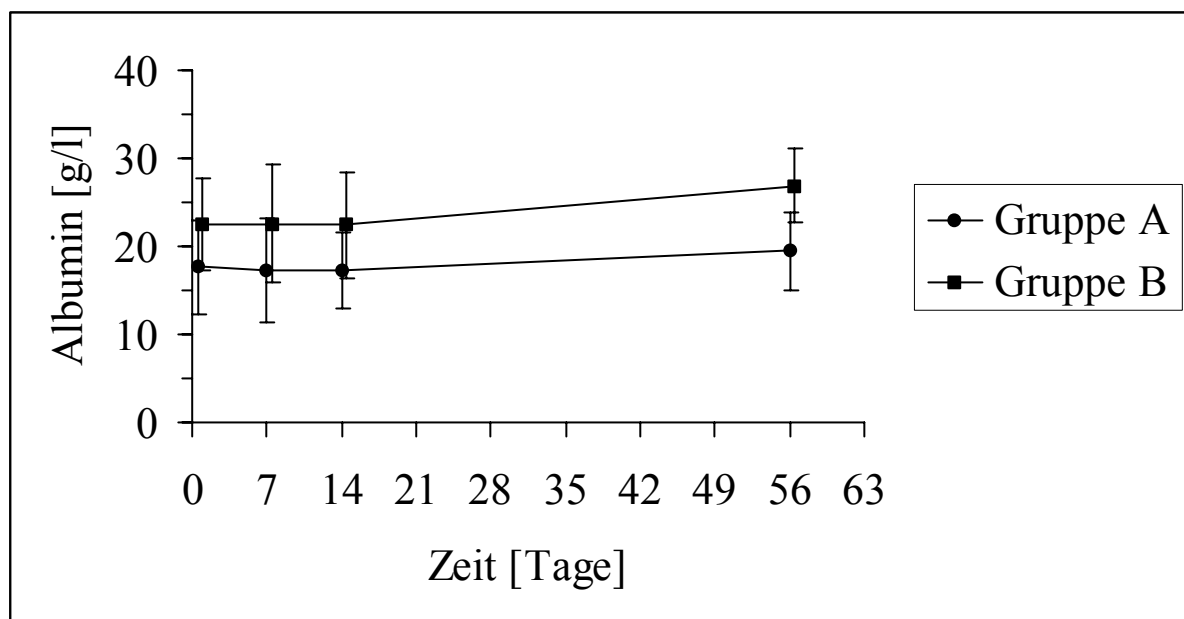
Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf des Protein-Kreatinin-Quotienten im geometrischen Mittelwert mit Streufaktor bei den Patientengruppen A und B



Die Aktivitäten der Leberenzyme GPT, AP und GLDH im Blutplasma waren über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil. Ferner zeigte weder das Gesamtbilirubin noch das direkte Bilirubin sowie die Glukosekonzentration im Blutplasma signifikante Veränderungen im Zusammenhang mit der Therapie mit Ol-PC.

Mit $p = 0,001$ war ein signifikanter Anstieg der Konzentration von Albumin im Blutplasma zu verzeichnen. Der Verlauf der Albuminkonzentration wird in Abbildung 34 dargestellt. Auch hier zeigte sich erneut bei der statistischen Auswertung, dass der Anstieg des Albumins nicht innerhalb der ersten 14 Tage sondern über den gesamten Zeitraum signifikant ist. Der Gruppenunterschied erwies sich bei Albumin mit $p = 0,001$ als signifikant. Die Globulinkonzentration änderte sich weder während des Behandlungszeitraumes noch über 6 Wochen signifikant.

Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der Albuminkonzentration im arithmetischen Mittelwert mit Standardabweichung bei den Patientengruppen A und B



Die Aktivitäten der Pankreasenzyme zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Veränderungen.

4.5 Mikroskopischer Erregernachweis und PCR

Die mittels Punktion und Aspiration gewonnenen Knochenmarkproben der leishmaniosekranken Patienten wurden sowohl einer zytologischen Untersuchung als auch einer PCR zum Nachweis von genomischer DNA unterzogen. Auf diese Weise konnte neben einem direkten Erregernachweis auch eine Bewertung der Blutzellbildung im Knochenmark durchgeführt werden. Da im Rahmen der Infektion des Knochenmarkes die Differenzierung und Reifung der Zellreihen gestört sein kann, war die Bewertung der Blutzellbildung im Knochenmark bei Patienten, die im Rahmen der Leishmaniose eine Anämie, Thrombozytopenie oder Leukopenie aufwiesen, von besonderem diagnostischen und prognostischen Interesse.

Mögliche Heilungserfolge – im Sinne einer Erregerfreiheit des Knochenmarkes nach Abschluß der Therapie mit Ol-PC – sollten sowohl im Vergleich der einzelnen Patientengruppen als auch gruppenübergreifend ausgewertet werden. Die statistische Auswertung des Erregerstatus vor und nach Therapie erfolgte hierbei aufgrund der Untersuchungsbefunde der PCR. Da die Auswertung zytologischer Präparate zum Erregernachweis in der Literatur lediglich mit einer geringen Sensitivität beschrieben wird (FERRER, 1999; CIARAMELLA et al., 1997), wurde auf die statistische Auswertung dieser Befunde verzichtet. In Einzelfällen war jedoch bei positivem zytologischem Befund kein Erregererbgut mittels PCR nachweisbar, so dass hier die Diagnosestellung mittels Zytologie erfolgte.

Bei der gruppenübergreifenden Auswertung muß darauf hingewiesen werden, dass die verschiedenen Dosierungen und Injektionszeitpunkte in den einzelnen Gruppen unberücksichtigt bleiben. Diese Ergebnisse sind somit nur eingeschränkt beurteilbar.

4.5.1 Mikroskopischer Erregernachweis vor Therapie

Eine zytologische Untersuchung von Knochenmarkpunktaten wurde bei allen Patienten vor dem Beginn der Therapie mit Ol-PC durchgeführt. Bei 19 Tieren konnten in diesem Zusammenhang Leishmanien mikroskopisch nachgewiesen werden (das entspricht 70,4 %). Die mikroskopische Untersuchung der Knochenmarkpunktate bei den übrigen Patienten (n = 8 oder 29,6 %) erbrachte ein negatives Ergebnis.

Neben dem Erregerstatus wurde vor Therapiebeginn auch die Hämatopoese bewertet. Nahezu ein Viertel der Tiere (n = 6 oder 22,2 %) zeigte eine verminderte Zellularität. Ein Drittel der Tiere (n = 9 bzw. 33,3 %) wies eine verminderte Erythropoese auf, bei fast einem Fünftel (n = 5 oder 18,5 %) der zur Therapie vorgestellten Hunde war eine verminderte Megakaryopoese zu verzeichnen. 14,8 % der Patienten (n = 4) fielen durch eine herabgesetzte Myelopoese auf. Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen in den einzelnen Gruppen sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Befunde der zytologischen Untersuchung des Knochenmarkes innerhalb der verschiedenen Patientengruppen vor Therapie

Befund	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	insgesamt
positiver Leishmaniennachweis	1 (3,7 %)	8 (29,6 %)	10 (37,0 %)	19 (70,4 %)
negativer Leishmaniennachweis	2 (7,4 %)	4 (14,8 %)	2 (7,4 %)	8 (29,6 %)
verminderte Zellularität	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)	2 (7,4 %)	6 (22,2 %)
verminderte Erythropoese	1 (3,7 %)	5 (18,5 %)	3 (11,1 %)	9 (33,3 %)
verminderte Megakaryopoese	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)	5 (18,5 %)
verminderte Myelopoese	0	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)	4 (14,8 %)

4.5.2 Mikroskopischer Erregernachweis nach Therapie

Bei 16 Patienten konnten nach Beendigung der Therapie erneut Knochenmarkpunktate gewonnen und zytologisch untersucht werden. Der Anteil der positiven Befunde lag bei 25,0 % (n = 4). 3 weitere Tiere (18,8 %) wiesen leishmanienähnliche Strukturen im Zytoplasma der Makrophagen auf, die nicht eindeutig von phagozytierten Bestandteilen anderer Herkunft zu differenzieren waren, so dass bei ihnen der Verdacht auf Leishmanien bestand. Bei mehr als der Hälfte der untersuchten Proben (n = 9 oder 56,3 %) konnten nach der Therapie keine Erreger zytologisch nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung war bei einem Tier (das entspricht 6,3 %) eine verminderte Zellularität zu verzeichnen. Während bei einem Viertel der Patienten (n = 4 oder 25,0 %) eine verminderte Erythropoese vorlag, betrug

der prozentuale Anteil einer herabgesetzten Megakaryopoese bzw. Myelopoese 12,5 % (n = 2) bzw. 6,3 % (n = 1). Tabelle 27 zeigt die Befunde der zytologischen Untersuchung des Knochenmarkes zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung.

Tabelle 27: Befunde der zytologischen Untersuchung des Knochenmarkes innerhalb der verschiedenen Patientengruppen nach Therapie

Befund	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	insgesamt
positiver Leishmaniennachweis	1 (6,3 %)	3 (18,8 %)	0	4 (25,0 %)
Verdacht auf Leishmanien	0	3 (18,8 %)	0	3 (18,8 %)
negativer Leishmaniennachweis	2 (12,5 %)	3 (18,8 %)	4 (25,0 %)	9 (56,3 %)
verminderte Zellularität	0	1 (6,3 %)	0	1 (6,3 %)
verminderte Erythropoese	0	3 (18,8 %)	1 (6,3 %)	4 (25,0 %)
verminderte Megakaryopoese	0	2 (12,5 %)	0	2 (12,5 %)
verminderte Myelopoese	0	1 (6,3 %)	0	1 (6,3 %)

4.5.3 PCR vor Therapie

Da bei 2 Patienten (Hunde Nr. 5 und 12) aufgrund einer zu geringen Menge des gewonnen Knochenmarkpunktates lediglich eine zytologische Untersuchung eingeleitet werden konnte (beide Patienten erbrachten ein positives zytologisches Ergebnis), gingen insgesamt 25 Patienten in die Auswertung mittels PCR ein. Bei 22 Patienten (das entspricht 88,0 %) konnte Erregererbgut in den Proben nachgewiesen werden. 3 Tiere (12,0 %) zeigten vor der Therapie ein negatives Ergebnis in der PCR. Tabelle 28 zeigt den prozentualen Anteil positiver PCR-Befunde in den einzelnen Patientengruppen vor Therapie.

Tabelle 28: Befunde der PCR innerhalb der verschiedenen Patientengruppen vor Therapie

Befunde	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	insgesamt
PCR positiv	2 (8,0 %)	10 (40,0 %)	10 (40,0 %)	22 (88,0 %)
PCR negativ	1 (4,0 %)	0	2 (8,0 %)	3 (12,0 %)

4.5.4 PCR nach Therapie

Zur Überprüfung eines möglichen Heilungserfolges gingen insgesamt 16 Proben von zuvor mit Ol-PC behandelten Hunden in die Auswertung ein. Bei 14 Patienten konnte in diesem Zusammenhang Erregererbgut nachgewiesen werden (das entspricht 87,5 %). 2 Patienten (12,5 %) erbrachten einen negativen Befund. In Tabelle 29 werden die PCR-Befunde der Patientengruppen zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung aufgeführt.

Tabelle 29: Befunde der PCR innerhalb der verschiedenen Patientengruppen nach Therapie

Befunde	Vorversuch	Gruppe A	Gruppe B	insgesamt
PCR positiv	3 (18,8 %)	9 (56,3 %)	2 (12,5 %)	14 (87,5 %)
PCR negativ	0	0	2 (12,5 %)	2 (12,5 %)

Wegen zu geringer Patientenzahlen im Vorversuch konnte in dieser Patientengruppe keine statistische Auswertung möglicher Heilungserfolge in Bezug auf eine Erregerfreiheit im Knochenmark durchgeführt werden. Ebenso verhält es sich mit Patienten der Gruppe B, da auch hier eine zu geringe Patientenzahl zur Nachuntersuchung des Knochenmarkes zur Verfügung stand. Bei Patienten der Gruppe A konnte nach der Therapie kein signifikant erhöhter Anteil von Tieren mit einer Erregerfreiheit im Knochenmark nachgewiesen werden. Auch gruppenübergreifend waren keine signifikant häufigen Heilungserfolge nachweisbar.

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen die PCR-Befunde der Patienten Nr. 4 – 11 der Gruppe A. Sie umfassen neben der Darstellung des Erregererbgutes in den Knochenmarkproben der Patienten auch die Darstellung des „house-keeping“ Gens GAPDH, welches eine sachgemäße Isolierung von DNA aus dem Knochenmark sicherstellt. Aufgrund des grossen Probenumfanges wurde auf die Abbildung der Befunde der übrigen Patientenproben verzichtet.

Abbildung 35: Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Nachweis von genomischer DNA für GAPDH im Knochenmark der leishmaniosekranken Hunde (Gruppe A, Patienten Nr. 4 - 11) in einem 2%igem Agarosegel

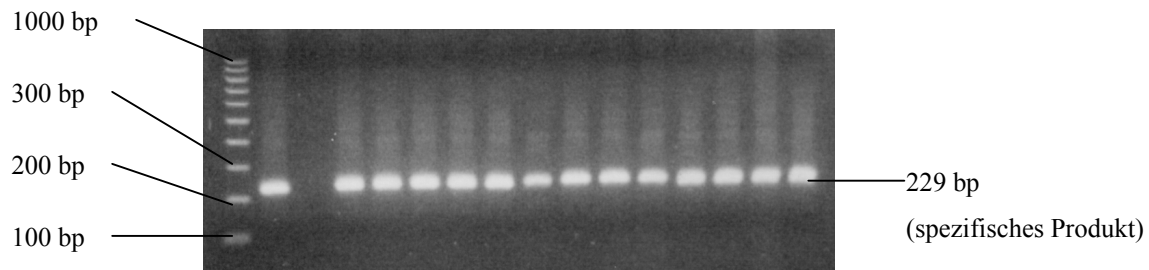
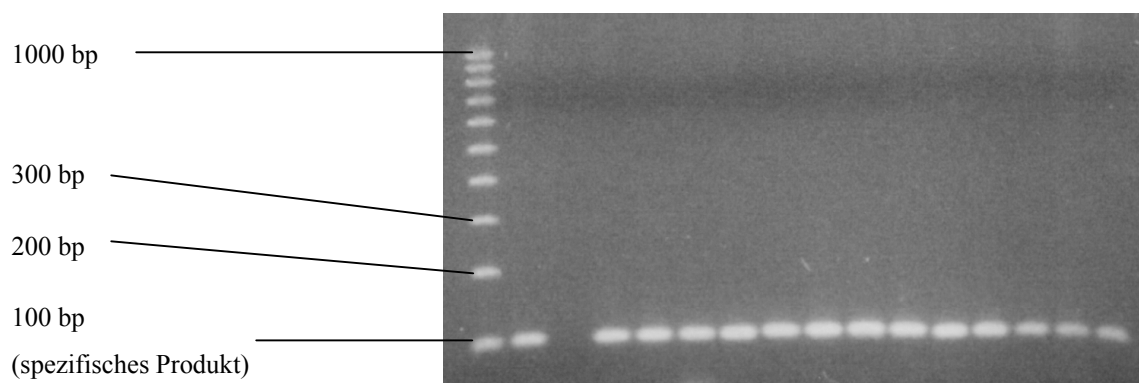


Abbildung 36: Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Nachweis von parasitärer DNA für *L.infantum* im Knochenmark der leishmaniosekranken Hunde (Gruppe A, Patienten Nr. 4 - 11) in einem 2%igem Agarosegel



Positionen der untersuchten Proben (Abbildung 35 und 36):

Spur 1: 100 bp-Leiter; Spur 2: Positivkontrolle; Spur 3: Negativkontrolle; Spur 4: Patient Nr. 4 vor Therapie; Spur 5: Patient Nr. 4 nach Therapie; Spur 6: Patient Nr. 6 vor Therapie; Spur 7: Patient Nr. 6 nach Therapie; Spur 8: Patient Nr. 7 vor Therapie; Spur 9: Patient Nr. 8 vor Therapie; Spur 10: Patient Nr. 8 nach Therapie; Spur 11: Patient Nr. 9 vor Therapie; Spur 12: Patient Nr. 9 nach Therapie; Spur 13: Patient Nr. 10 vor Therapie; Spur 14: Patient Nr. 10 nach Therapie; Spur 15: Patient Nr. 11 vor Therapie; Spur 16: Patient Nr. 11 nach Therapie

5. Diskussion

Die Behandlung der kaninen Leishmaniose mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapeutika gestaltet sich häufig schwierig. Neben hohen Kosten schränken zum Teil deutliche Nebenwirkungen sowie die Entwicklung von Resistenzen den Einsatz der Medikamente ein. Zudem ist bisher kein Präparat in der Lage, die Erreger vollständig aus dem Knochenmark zu eliminieren (GOTHE, 1991; NOLI, 1999; BANETH, 2002). Daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze unerlässlich (BANETH und SHAW, 2002).

Das zur Behandlung der Leishmaniose beim Menschen entwickelte Hexadecylphosphocholin (Miltefosin[®], Zentaris AG) zeigte in vielen Studien eine gute klinische Wirksamkeit (EIBL und UNGER, 1990; KUHLENCORD et al., 1992; SUNDAR et al., 1998; HERWALDT, 1999; JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 1999; MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000; BANETH, 2002). Leider ist der Einsatz beim Hund häufig mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden (BANETH, 2002; DEPLAZES und METTLER, 2003) und scheint sich aus diesem Grund nicht zur Behandlung der kaninen Leishmaniose zu eignen.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Studie ein dem Hexadecylphosphocholin strukturell eng verwandter Wirkstoff – das Oleyl-Phosphocholin (Ol-PC) - eingesetzt. Ziel der eigenen Untersuchungen war es, neben der Prüfung der klinischen Wirksamkeit auch den Einfluß des Präparates auf krankheitsbedingt veränderte Parameter in Blut und Urin zu prüfen. Außerdem sollte untersucht werden, ob im Rahmen der Behandlung mit Ol-PC eine Erregerfreiheit des Patienten zu erzielen ist. Mögliche Nebenwirkungen sollten erfasst und deren Tolerierbarkeit überprüft werden. Die Auswertung der Ergebnisse muß unter Berücksichtigung der Patientendaten erfolgen, da diese die Befunde nachhaltig beeinflussen können.

Abschließend sollen die Ergebnisse der Studie bezüglich klinischer Wirksamkeit, Remissionszeit, Nebenwirkungen und Heilungsrate mit den in der Literatur beschriebenen Angaben zur Therapie der kaninen Leishmaniose mit N-Methyl-Glucamin (Glucantime[®], Rhône Mérieux) - dem derzeitigen Mittel der Wahl - verglichen werden.

5.1 Patienten

5.1.1 Alter der Patienten

Obwohl die Leishmaniose keine Altersprädisposition aufweist, wird die Erkrankung auf Grund ihrer langen Inkubationszeit nur selten bei sehr jungen Tieren diagnostiziert (NOLI, 1999). Außerdem bedingt der lebensverkürzende Effekt der Leishmaniose, dass die Krankheit selten bei sehr alten Hunden festgestellt wird (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999). Diese in der Literatur beschriebenen Beobachtungen treffen auch für die eigenen Untersuchungen zu: Kein Patient war jünger als 1 Jahr und lediglich zwei Patienten wiesen ein Alter von über 8 Jahren auf. Die überwiegende Mehrheit der behandelten Tiere (92,5 %) war zwischen 1 und 8 Jahren alt. Auch diese Beobachtung entspricht annähernd den Literaturangaben: GOTHE (1991) wertete 187 Leishmania-infizierte Patienten aus und stellte fest, dass das Alter der meisten Tiere zwischen 2 und 10 Jahren lag. CIARAMELLA et al. (1997) untersuchten 150 erkrankte Hunde und gaben für die meisten Tiere ein Alter zwischen 3 und 7 Jahren an.

Da das Durchschnittsalter der zur Therapie mit Ol-PC vorgestellten Hunde 4,2 Jahre betrug, ist eine negative Beeinflussung der Ergebnisse auf Grund eines sehr hohen Durchschnittsalters – beispielsweise durch die Einschränkung von Organfunktionen geriatrischer Patienten - nicht zu erwarten.

5.1.2 Geschlechtsverteilung

Bei der Leishmaniose handelt es sich um eine Erkrankung ohne geschlechtsspezifische Prädisposition (NOLI, 1999). Diese Angabe entspricht den eigenen Beobachtungen, da männliche und weibliche Tiere etwa zu gleichen Anteilen in der Studie vertreten waren.

5.1.3 Rassen- und Gewichtsverteilung

Laut NOLI (1999) liegt für diese Erkrankung keine Rasseprädisposition vor. Jedoch scheinen kleinere Rassen möglicherweise wegen ihrer eher häuslichen Lebensweise seltener betroffen zu sein als grössere Tiere. In den eigenen Untersuchungen wurde kein Hund mit einem Gewicht unter 5 kg vorgestellt und nur etwa ein Zehntel der Patienten (n = 3 bzw. 11,1 %) wog unter 10 kg.

CIARAMELLA et al. (1999) stellten aufgrund ihrer Untersuchungen fest, daß die überwiegende Mehrheit der Patienten Mischlingshunde sind. In den eigenen Untersuchungen dominierten ebenfalls Mischlingshunde mit insgesamt 63,0 % gegenüber reinrassigen Hunden mit 37,0 %. Eine Rassedisposition ist somit auch hier nicht feststellbar. Jedoch muß in diesem Zusammenhang bedacht werden, dass der erhöhte Anteil von Mischlingshunden vermutlich nicht auf eine erhöhte Empfindlichkeit dieser Tiere gegenüber den Erregern zurückzuführen ist. Vielmehr handelt es sich bei der überwiegenden Mehrheit der importierten Tiere in der Regel um eingefangene, zuvor freilebende Hunde aus einer Population mit einem hohen Anteil von Mischlingen, die auf Grund ihrer Lebensweise den Parasiten und ihren Vektoren fortwährend ausgesetzt waren.

5.1.4 Auslandsanamnestik

Die zur Behandlung mit Ol-PC vorgestellten Tiere wurden überwiegend aus Spanien importiert. GOTHE (1991) fand bei seinen Untersuchungen ebenfalls einen erhöhten Anteil von aus Spanien stammenden Patienten. Weitere Patienten kamen überwiegend aus anderen südeuropäischen Ländern wie beispielsweise Italien oder Griechenland. Er begründete dies nicht mit einem erhöhten Infektionsrisiko in diesen Ländern gegenüber anderen endemischen Gebieten, sondern mit der Tatsache, dass es sich hierbei um für deutsche Touristen häufig besuchte Urlaubsziele handelt, in denen die Vermittlung von herrenlosen Tieren auf Grund eines großen tierschützerischen Engagement gut organisiert ist.

Von entscheidender Bedeutung für die Auswertung der Befunde erscheint die Tatsache, dass kein Tier nach Abschluß der Therapie erneut in endemische Gebiete verbracht wurde. Eine mögliche Reinfektion kann auf diese Weise ausgeschlossen werden.

5.1.5 Vorbehandlung

Fast die Hälfte der Hunde ($n = 13$ oder 48,1 %), die zur Behandlung mit Ol-PC vorgestellt wurden, waren bereits mit Allopurinol oder Glucantime[®] vorbehandelt. Häufig führte ein Nichtansprechen dieser Therapien zur Vorstellung in der Klinik für Kleintiere in Giessen. Die Ursachen für die geringe Wirkungsweise der vorherigen Behandlungen sind nicht bekannt. Jedoch muß bei der Auswertung der Ergebnisse bedacht werden, dass es sich gegebenenfalls zum Teil um eine vorselektierte Patientenpopulation handelt, die nur eingeschränkt therapierbar erscheint. Ursachen könnten hierfür beispielsweise ein vorherrschendes

Zytokinmuster mit dominierenden Th-2-Zellen, ein hohe Erregerdichte oder Patienten mit einer überwiegend chronischen Symptomatik sein.

5.1.6 Vorliegen weiterer Reisekrankheiten

Bei 2 Patienten (Hunde Nr. 10 und 12) lagen neben einer Leishmaniose noch weitere Infektionen vor, die sich die Tiere während ihres Aufenthaltes im Ausland zugezogen haben. Bei diesen Tieren muß bei der Interpretation des Behandlungserfolges in den nachfolgenden Kapiteln unter Umständen bedacht werden, dass diese Coinfektionen die Symptomatik und in diesem Zusammenhang auch die Prognose des Tieres nachhaltig verschlechtern können, ohne dass dies auf ein Scheitern der Therapie mit Ol-PC zurückzuführen ist.

5.2 Klinische Wirksamkeit

Zur Bewertung der klinischen Wirksamkeit des Präparates sollte neben der Besserung der klinischen Symptomatik auch die Dauer der klinischen Beschwerdefreiheit nach erfolgter Therapie berücksichtigt werden. Daher wurde sowohl die Symptomatik vor und nach Therapie mittels Mc-Nemar-Test hinsichtlich signifikanter Veränderungen überprüft, als auch die Dauer der Remissionszeit mittels Mantel-Cox-Test beurteilt.

Betrachtet man die Literaturangaben über die prozentuale Häufigkeit der verschiedenen klinischen Symptome der Leishmaniose, so variieren diese deutlich (SLAPPENDEL, 1988; GOTHE, 1991; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigten zum Teil ebenfalls deutliche Abweichungen von den Angaben in der Literatur. Jedoch zählten auch hier Hautveränderungen, generalisierte Lymphknotenvergrößerung und Lethargie zu den am häufigsten diagnostizierten Befunden. Bei den Hautveränderungen dominierte entsprechend den Literaturangaben eine exfoliative Dermatitis (NOLI, 1999). Weiterhin wurden ulzerative Veränderungen der Haut auch in den eigenen Untersuchungen sehr häufig diagnostiziert. Bei etwa der Hälfte der Patienten konnten blasse Schleimhäute festgestellt werden. Ähnliche Angaben finden sich bei CIARAMELLA et al. (1997), die das Auftreten dieses Symptoms bei 58 % der betroffenen Tiere beschreiben. Selten zu beobachtende Symptome waren dagegen Gewichtsverlust und Epistaxis, welche in den eigenen Untersuchungen jeweils bei etwa einem Fünftel der leishmaniosekranken Hunde zu verzeichnen waren. Auch diese Beobachtungen spiegeln sich in einigen Literaturangaben wieder (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999). Obwohl der in der Regel chronische Verlauf der Erkrankung häufig eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion nach sich ziehen

kann, manifestierte sich lediglich bei 11,1 % der Patienten eine Niereninsuffizienz. NOLI (1999) gibt für dieses Symptom eine prozentuale Häufigkeit von 16 – 32 % an. Die prozentuale Häufigkeit von Fieber und Anorexie wird in der Literatur mit bis zu 70 % beschrieben (NOLI, 1999). In den eigenen Untersuchungen wurden diese Symptome nur in Einzelfällen diagnostiziert. Dies entspricht den Beobachtungen von CIARAMELLA et al. (1997), die bei 17 % der Patienten Anorexie und bei 4 % der leishmaniosekranken Hunde Fieber feststellen konnten. Über ein Viertel der Patienten ($n = 7$ bzw. 25,9 %) wies in der vorliegenden Studie Bewegungsstörungen auf, die sich in der Regel in rezidivierenden Lahmheiten äußerten. Einen ähnlich hohen prozentualen Anteil dieses Symptoms verzeichnete auch SLAPPENDEL (1988) mit 37,5 % bei den leishmaniosekranken Hunden seiner Untersuchung. Abweichend hierzu gibt NOLI (1999) eine Beteiligung der Gelenke am Krankheitsgeschehen in nur 4 – 4,6 % der Fälle an. Möglicherweise führen unterschiedliche Bewertungskriterien für das Symptom „Arthropathie“ zu diesen deutlich abweichenden Befunden.

Bevor eine statistische Auswertung der klinischen Wirksamkeit des Präparates erfolgt, soll zunächst auf die Schwierigkeiten hingewiesen werden, die sich bei der Erfassung der Patientendaten ergaben:

1. Trotz einer ausreichenden Patientenzahl führte die unterschiedliche Manifestation der Erkrankung dazu, dass einige Symptome selten auftraten. Somit ist die statistische Auswertung der klinischen Wirksamkeit von Symptomen nicht möglich, die in zu geringer Frequenz vorlagen ($n < 5$). Dies war insbesondere für den Gruppenvergleich von entscheidender Bedeutung, da hier in beiden Gruppen ein Symptom in ausreichender Häufigkeit vorhanden sein musste. Bei einigen Symptomen war dies leider nicht der Fall.
2. Erschwerend wirkte sich die Tatsache aus, dass einige Patienten nicht von ihren Besitzern zur Nachuntersuchung vorgestellt wurden. Die entsprechenden Daten lagen somit nicht zur Auswertung vor. Um diesen „Datenverlust“ nach Möglichkeit einzuschränken, wurde der Verlauf einiger Symptome (z.B. Anorexie, Lethargie, Gewichtsverlauf) telefonisch bei den Besitzern abgefragt. Symptome, die wegen mangelnder fachlicher Kenntnisse nicht von den Besitzern beurteilt werden konnten (z.B. generalisierte Lymphknotenvergrößerung) blieben bei der nachfolgenden Auswertung unberücksichtigt.

3. Eine weiterführende intensive medizinische Betreuung während des stationären Aufenthaltes, z.B. in Form von Infusionen bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz, die Verabreichung einer Bluttransfusion bei lebensbedrohlichen Anämien oder die Gabe von Doxzyklin zur Behandlung einer gleichzeitig vorliegenden Ehrlichiose kann die Entwicklung der klinischen Symptomatik deutlich beeinflussen. Dies muß bei der Auswertung der Befunde gegebenenfalls berücksichtigt werden.
4. Nach Abschluß der Behandlung mit Ol-PC wurde einigen Tiere Allopurinol in einer Dosierung von 10 mg/kg KGW zwei mal täglich auf Dauer verabreicht. Auch hier muß eine mögliche Beeinflussung der klinischen Symptomatik und der Remissionszeit bedacht werden.
5. Da es sich bei zwei Drittel der Patienten, die zur Therapie mit Ol-PC vorgestellt wurden, um bereits erfolglos vorbehandelte Tiere handelt, muß eine mögliche Vorselektion in der Patientenpopulation und infolgedessen eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.
6. Patienten, die unter chronischen Symptomen im Rahmen einer Immunkomplexerkrankung (z.B. Niereninsuffizienz, Arthropathien) litten, wurden ebenfalls in die Studie aufgenommen. Eine Besserung der Symptome ist bei diesen Patienten allerdings nur bedingt zu erwarten, so dass auch durch diese Befunde das Ergebnis der Studie negativ beeinflusst werden kann.

Obwohl einige Symptome bei einer zu geringen Patientenzahl zu verzeichnen waren und daher nicht bezüglich der Wirksamkeit von Ol-PC statistisch ausgewertet werden konnten, deuten die Ergebnisse auf eine gute klinische Wirksamkeit des Präparates hin. Betrachtet man die Gesamtheit aller Symptome, so ergaben sich hier sowohl für Gruppe A als auch für Gruppe B signifikante Besserungen der Krankheitsanzeichen. Hinweise auf eine unterschiedliche klinische Wirksamkeit in diesen beiden Patientengruppen lagen nicht vor. Jedoch liegen Hinweise auf eine geringere klinische Wirksamkeit bezüglich des Vorversuchs vor. Ursache hierfür könnte die geringere Dosierung des Wirkstoffes ($4,2 \mu\text{mol/kg}$) bei einer geringeren Anzahl von Injektionen (5) pro Behandlungsintervall sein.

14,8 % der Hunde ($n = 4$) zeigten keine Besserung der krankheitsbedingten Veränderungen. Zu diesen Patienten zählten 2 Tiere (Patient Nr. 6 und Nr. 23) mit einer dekompensierten chronischen Niereninsuffizienz. Eine Besserung dieser Symptomatik trotz begleitender Infusionstherapie kann auf Grund des chronischen Charakters und des fortgeschrittenen

Erkrankungsstadium nur eingeschränkt erwartet werden. Ein weiteres Tier (Patient Nr. 12) wies neben der Leishmaniose eine Infektion mit *Ehrlichia canis* auf und musste aufgrund rezidivierender Blutungen bei einer hochgradigen Thrombozytopenie euthanasiert werden. Das Ausbleiben der Besserung ist in diesem Fall höchstwahrscheinlich auf die Ehrlichiose zurückzuführen, da solch hochgradige Thrombozytopenien in der Regel nicht durch eine Leishmaniose hervorgerufen werden. Der Patient wies zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme $14 \times 10^9/l$ Thrombozyten im Blut auf. Bei dem vierten Patienten (Hund Nr. 20) handelte es sich um einen Therapiewiederholer, der im Rahmen der ersten Behandlung eine gute Besserung der klinischen Symptomatik gezeigt hatte. Ob in diesem Zusammenhang die verminderte Wirksamkeit des Präparates auf einer verringerten Ansprechbarkeit der Erreger nach der ersten Therapie beruht, konnte bisher nicht geklärt werden.

Im Anschluß an die Durchführung der Therapie fiel bei der weiteren Beobachtung einiger Patienten auf, dass sich die klinische Symptomatik auch nach Erhalt aller Injektionen in den darauffolgenden Tagen und zum Teil Wochen kontinuierlich besserte. Ursächlich könnte hierfür beispielsweise eine lange Halbwertszeit des Wirkstoffes in Betracht gezogen werden. Ergebnisse pharmakokinetischer Untersuchungen bezüglich Ol-PC liegen jedoch nicht vor. Allerdings könnte die lange Halbwertszeit des Strukturanalogons Hexadecylphosphocholin, die mit 8 Tagen angegeben wird (MURRAY et al., 2000), auf eine ähnlich lange Zeitspanne bei Ol-PC hinweisend sein. Möglicherweise könnte auch eine Reduktion der Erregerzahl nach initialer Therapie zu einer Regeneration der körpereigenen Abwehr und somit zu einer fortschreitenden Besserung der klinischen Symptomatik nach dem Behandlungsende führen.

Als einschränkend für den Einsatz von Ol-PC in den vorgegebenen Dosierungen muß die kurze klinische Remissionszeit angesehen werden. Die Hälfte der Patienten der Gruppe A, bzw. die Hälfte der Patienten der Gruppe B zeigte eine deutliche Verschlechterung der Symptome bereits 4 bzw. 7 Wochen nach Beendigung der Therapie. Eine Ursache für die Unterschiede der klinischen Remissionszeit beider Behandlungsgruppen ist nicht bekannt. Eine höhere Gesamtdosis, die die Patienten der Gruppe A mit $56 \mu\text{mol/kg}$ gegenüber Patienten der Gruppe B mit $47,7 \mu\text{mol/kg}$ erhielten, würde sogar eine nachhaltigere Wirkung des Präparates in Gruppe A vermuten lassen. Eventuell vermögen vielleicht die täglichen Injektionen über 9 Tage bei den Patienten der Gruppe B einen höheren Wirkstoffspiegel und damit eine raschere und effizientere Reduktion der Erregerdichte zu erzielen, als dies nach

dem Behandlungsschema der Gruppe A der Fall ist (4 Injektionen an aufeinanderfolgenden Tagen, 4 weitere Injektionen jeweils jeden 2. Tag).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich bei der Anwendung des Präparates Hinweise auf eine gute klinische Wirksamkeit ergeben, jedoch die kurze Dauer der klinischen Remissionszeit den Einsatz des Präparates in den bisher vorgegebenen Dosierungen einschränkt. In diesem Zusammenhang sollte gegebenenfalls eine Erhöhung der Dosierung sowie eine Erhöhung der Anzahl der Injektionen für nachfolgende Untersuchungen überdacht werden.

Um auch Symptome in die Auswertung einbeziehen zu können, die bisher auf Grund einer zu geringen Patientenzahl mit diesen Krankheitsanzeichen nicht ausgewertet werden konnten, sind weitere Untersuchungen bei einer größeren Anzahl von Patienten notwendig. In diesem Zusammenhang empfiehlt sich die Behandlung bisher nicht therapierter leishmaniosekranker Hunde, um eine Vorselektion schwierig zu therapierender Tiere generell zu vermeiden.

5.3 Nebenwirkungen

Im Rahmen der Behandlung leishmaniosekranker Hunde mit Ol-PC fielen vor allem gastrointestinale Symptome sowie Schwellungen im Bereich der Injektionsstellen und eine erhöhte Körpertemperatur bzw. Fieber bei den Patienten auf.

Bei der Erfassung und Auswertung der Nebenwirkungen ergaben sich folgende Schwierigkeiten:

1. Einige Patienten zeigten gastrointestinale Symptome oder Fieber bereits vor Behandlungsbeginn im Rahmen der Leishmaniose. Bei diesen Tieren waren daher im Verlauf der Therapie Krankheitssymptome und Nebenwirkungen schwer voneinander abzugrenzen. Hierzu zählten insbesondere die drei Hunde der Studie, die im Rahmen der Leishmaniose eine chronische Niereninsuffizienz aufwiesen und mit Inappetenz (Patient Nr. 5) bzw. Anorexie (Patient Nr. 7 und 23) in der Klinik vorgestellt wurden. Zu Beginn der Therapie zeigte Patient Nr. 7 zunächst Inappetenz, die sich jedoch bald besserte. Bei den Patienten Nr. 5 und 23 blieb die reduzierte Futteraufnahme über den gesamten Behandlungszeitraum bestehen. Beide Patienten entwickelten unter der Therapie weitere gastrointestinale Symptome (Vomitus und

Diarrhoe). Ob diese Symptome im Rahmen der fortschreitenden Niereninsuffizienz oder als unerwünschte Wirkung des Präparates zu werten sind, bleibt offen. Hund Nr. 16 wurde im Rahmen der Erkrankung mit therapieresistentem Fieber vorgestellt. Auch hier blieb unter Therapie die Körpertemperatur zunächst weiter erhöht. Eine Abgrenzung zwischen klinischem Symptom und Nebenwirkung ist somit auch hier nicht möglich.

2. Patient Nr. 2 litt bereits vor Beginn der Therapie an Diarrhoe. Bei einer Kotuntersuchung konnte ein erhöhtes Vorkommen von *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden. Diese gram-positiven Bakterien können bei Hunden Diarrhoen verursachen (JERGENS und WILLARD, 2000). Im folgenden Therapieverlauf zeigte das Tier in den ersten 4 Behandlungstagen weiterhin breiigen Kotabsatz. Die Infektion des Tieres mit *Clostridium perfringens* erschwert somit die Differenzierung von einer unerwünschten Wirkung des Ol-PC.
3. Hund Nr. 10 erhielt zur Therapie der zu Behandlungsbeginn diagnostizierten Ehrlichiose Doxycyclin. Das zu den Tetracyclinen zählende Antibiotikum kann gastrointestinale Störungen wie Vomitus und Diarrhoe verursachen (KROKER, 2002). Der Patient zeigte im Rahmen der Behandlung neben Inappetenz und Anorexie auch breiigen Kotabsatz und Vomitus. Ob ursächlich das Doxycyclin oder das Ol-PC für diese Symptomatik verantwortlich ist, konnte nicht geklärt werden.

Da bisher keine weiteren Untersuchungsergebnisse über den Einsatz von Ol-PC bei Hunden bekannt sind, liegen in der Literatur keine Hinweise auf Nebenwirkungen dieses Wirkstoffes vor. Auf Grund der engen strukturellen Verwandtschaft bietet sich jedoch ein Vergleich der Nebenwirkungen des Hexadecylphosphocholins an, welches in zahlreichen Studien beim Menschen und auch beim Hund zur Behandlung der Leishmaniose eingesetzt wurde.

EIBL (2000) berichtet von hochgradigen, nicht zu tolerierenden Ulzerationen im Bereich der Injektionsstelle nach subkutaner Verabreichung von Hexadecylphosphocholin. Die subkutane Injektion von Ol-PC führte dagegen in der Regel lediglich zu mittelgradigen Schwellungen. Hochgradige entzündliche und schmerzhaftige Schwellungen wurden nur in Einzelfällen beobachtet. Ulzerationen oder Abszessbildungen traten nicht auf. Diese Nebenwirkung ist daher als tolerierbar einzustufen zumal die Schwellungen unmittelbar nach Gabe der letzten Injektion ohne zurückbleibende Schädigung des betroffenen Gewebes verschwanden. Nur bei Patient Nr. 20 dauerten die Schwellungen laut Besitzerangaben noch über mehrere Tage nach

der letzten Injektion an. Dieser Hund wies zuvor hochgradige, schmerzhafte Schwellungen der Injektionsstelle auf. Da dieses Tier bereits einer 2. Behandlung mit Ol-PC unterzogen wurde, ist eine Sensibilisierung gegen das Präparat nicht sicher auszuschließen. Der zweite Patient, der mehrfach mit Ol-PC behandelt wurde, zeigte jedoch keine Zunahme der Symptomatik nach erneuter Verabreichung des Wirkstoffes. Die Nebenwirkungen scheinen in ihrer Ausprägung nicht von der Dosierung des Wirkstoffes abhängig zu sein, da zwischen den Patienten der Gruppe A und der Gruppe B keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Schwellungen bestehen.

Gastrointestinale Symptome, in Form von Vomitus und Diarrhoe waren die am häufigsten zu beobachtenden Nebenwirkungen beim Einsatz von Hexadecylphosphocholin beim Menschen (SUNDAR et al., 1999). 62 % der Patienten zeigten bei der Therapie mit Miltefosin[®] gastrointestinale Symptome (JHA et al., 1999). Diese waren jedoch nur von kurzer Dauer und milder Ausprägung und traten 0,5 – 2 Stunden nach der Verabreichung des Medikamentes auf (HERWALDT, 1999; JHA et al., 1999). Beim Einsatz von Hexadecylphosphocholin bei Hunden waren schwerwiegende, nicht zu tolerierende gastrointestinale Symptome zu verzeichnen (BANETH und SHAW, 2002). DEPLAZES et al. (2003) berichtet in diesem Zusammenhang von einer Studie, die auf Grund der deutlichen Nebenwirkungen abgebrochen werden musste. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen mit Ol-PC waren gastrointestinale Symptome mit fast 90 % zwar auch bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten zu verzeichnen, jedoch musste in keinem Fall die Therapie auf Grund dieser Nebenwirkungen beendet werden. In den meisten Fällen traten die gastrointestinalen Symptome nur zeitweilig und in Form von Inappetenz und breiigem Kotabsatz auf. Auch diese Nebenwirkungen erscheinen somit tolerierbar. Die Intensität der Nebenwirkungen sind wahrscheinlich nicht von der Dosierung des Präparates abhängig, da keine signifikanten Unterschiede diesbezüglich zwischen den Patienten der Gruppe A und Gruppe B festgestellt werden konnten. Diese Beobachtung wurde auch beim Einsatz von Hexadecylphosphocholin in der Humanmedizin gemacht (JHA et al., 1999).

Über das Auftreten einer erhöhten Körpertemperatur bei der Verabreichung von Miltefosin[®] bei Menschen und Hunden sind bisher keine Angaben in der Literatur zu finden. Fraglich bleibt, ob es sich bei der erhöhten Körpertemperatur bzw. Fieber im Rahmen der Behandlung mit Ol-PC um eine Nebenwirkung im engeren Sinne handelt oder ob dieses Symptom sekundär bedingt ist. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise auch eine

Reaktion des Organismus auf eine erhöhte Anzahl absterbender Erreger unter der Therapie. Vergleicht man die Intensität der Nebenwirkungen zwischen den Behandlungsgruppen A und B, so fällt ein schwach signifikanter Unterschied auf. Das Auftreten einer erhöhten Körpertemperatur ist in Gruppe B deutlicher ausgeprägt als in Gruppe A. Eine Ursache konnte hierfür nicht gefunden werden zumal die Gesamtdosis des Wirkstoffes zum Zeitpunkt des Auftretens der Nebenwirkung (überwiegend in der Mitte des gesamten Behandlungszeitraumes) in Gruppe A mit 35 $\mu\text{mol/kg}$ sogar geringgradig höher ist als in Gruppe B mit 31,8 $\mu\text{mol/kg}$.

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass ein großer prozentualer Anteil der Patienten unter der Verabreichung von Ol-PC von Nebenwirkungen betroffen ist. Jedoch bestand bei keinem Patient die Notwendigkeit, die Behandlung auf Grund nicht zu tolerierender Nebenwirkungen zu beenden. Die unerwünschten Wirkungen des Präparates sind somit insgesamt als tolerierbar einzustufen.

5.4 Labordiagnostische Veränderungen

Die statistische Auswertung labordiagnostischer Parameter unter dem Einfluß der Therapie mit Ol-PC diente neben der Erfassung der Wirksamkeit bezüglich krankheitsbedingter Veränderungen im Blutbild und Urin auch der Erfassung von Nebenwirkungen. Hierbei galt es eine mögliche Toxizität des Wirkstoffes gegenüber den verschiedenen Organsystemen aufzudecken, bevor gegebenenfalls eine klinische Symptomatik in Erscheinung tritt. Die Befunde des Vorversuchs und der beiden Behandlungsgruppen A und B werden in diesem Zusammenhang auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse getrennt voneinander diskutiert. Zuvor wird die prozentuale Häufigkeit von labordiagnostischen Veränderungen in den eigenen Untersuchungen mit den Angaben in der Literatur verglichen.

Die in der Literatur befindlichen Angaben über die prozentuale Häufigkeit charakteristischer labordiagnostischer Veränderungen stimmt zum größten Teil mit den Befunden der eigenen Untersuchungen überein. So trat eine Hyperglobulinämie in den eigenen Untersuchungen bei 92,6 % der Patienten auf. Dieser hohe Anteil spiegelt sich in den Angaben von NOLI (1999) wieder, die eine prozentuale Häufigkeit von 70 – 100 % angibt. Während in Folge einer Hyperglobulinämie in 63,3 - 91 % der Fälle eine Hyperproteinämie zu resultieren scheint, konnte dies bei den eigenen Patienten nur bei 40,7 % beobachtet werden. Ursache hierfür sind die zum Teil hochgradigen Hypoalbuminämien, die eine Erhöhung des Gesamtproteins

unterdrücken. In einer Untersuchung von CIARAMELLA et al. (1997) an 150 leishmaniosekranken Hunden lag der prozentuale Anteil der Hypoalbuminämien bei 68 % der Patienten. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen, in denen eine erniedrigte Albuminkonzentration bei 59,3 % der Tiere zu verzeichnen war.

Die Angaben über die Häufigkeit von Anämien schwanken in der Literatur sehr deutlich und werden mit 21 – 94,2 % angegeben (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999). In der eigenen Arbeit traten Anämien mit 74,1 % vergleichsweise häufig auf.

SLAPPENDEL (1988) stellte bei fast einem Viertel der erkrankten Patienten eine Leukozytopenie fest. Leukozytosen traten dagegen wesentlich seltener auf. Eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl war nur bei etwa einem Zehntel der Tiere zu verzeichnen. Dies entspricht den eigenen Beobachtungen. Fast ein Drittel der leishmaniosekranken Hunde zeigte eine Leukozytopenie. Eine Leukozytose lag dagegen auch hier nur bei etwa einem Zehntel der Patienten vor.

In der Literatur wird die prozentuale Häufigkeit von Thrombozytopenien mit 29,3 – 50 % angegeben (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999). In den eigenen Untersuchungen trat eine Thrombozytopenie bei 25,9 % der Tiere auf.

In der vorliegenden Arbeit fiel nur ein geringer Anteil von Patienten mit einer Azotämie auf. Während in der Literatur die Angaben zwischen 16 – 45 % variieren (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999), war sie nur bei 11,1 % der eigenen Patienten zu verzeichnen. Auch ein erhöhter Proteinverlust über die Niere, trat nur bei 37 % der Patienten auf. Obwohl sich entsprechende Angaben in der Literatur finden, werden Proteinurien im Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen in der Regel bei der überwiegenden Mehrheit der Tiere festgestellt (SLAPPENDEL, 1988; NOLI, 1999). Für den relativ geringen Anteil von Patienten mit einer Nierenparenchymschädigung in der vorliegenden Arbeit könnten ursächlich gegebenenfalls die wiederholten Vorbehandlungen bei vielen Tieren in Betracht gezogen werden, die eine massive Schädigung der Niere bei Anstieg der Immunkomplexe frühzeitig verhindert haben.

Eine Erhöhung der Leberenzymaktivitäten, die auf einer Schädigung des Leberparenchyms beruht und im Rahmen eines akuten Krankheitsschubes auftreten kann, wurde in

verschiedenen Untersuchungen bei einer deutlich abweichenden Anzahl von Patienten festgestellt. Während SLAPPENDEL (1988) eine Erhöhung der Leberenzymaktivität bei 82 % der Tiere diagnostizierte, traten diese Veränderungen nur bei 16 % der Patienten von CIARAMELLA (1997) auf. In den eigenen Untersuchungen war bei keinem Tier eine Erhöhung von GPT, AP oder GLDH vor Behandlungsbeginn zu verzeichnen.

Infolge der geringen Patientenzahl im Vorversuch ist die Wirksamkeit des Präparates bezüglich krankheitsbedingter Veränderungen im Blutbild und Urin nur eingeschränkt statistisch auswertbar. Jedoch können sich aus der Beobachtung der labordiagnostischen Parameter Hinweise auf die Art und den Schweregrad möglicher Nebenwirkungen ergeben. Während sich die übrigen, hier nicht aufgeführten Parameter bei den Patienten des Vorversuchs als stabil erwiesen, waren folgende hämatologische Veränderungen zu verzeichnen:

1. Abfall der Erythrozytenzahl

Bei allen Patienten des Vorversuchs konnte im Rahmen der Behandlung mit Ol-PC ein initialer Abfall der Erythrozytenzahl beobachtet werden. Während Patient Nr. 3, der vor Behandlungsbeginn eine Anämie aufwies, bereits nach Beendigung der Therapie die Ausgangswerte wieder erreicht hatte, blieben die Werte von Patient Nr. 1 und Nr. 2 noch über einen längeren Zeitraum erniedrigt. Eine Ursache für das Absinken der Werte konnte bisher nicht eindeutig gefunden werden. Allerdings zeigte Patient Nr. 1 24 – 72 Stunden nach der ersten Injektion eine deutliche orange Färbung des Urins. Dies deutet auf eine intravasale Hämolyse hin. Bei dem strukturell eng verwandten Hexadecylphosphocholin (Miltefosin[®]) konnte eine Hämolyse im Zusammenhang mit einer intravenösen Verabreichung des Wirkstoffes beobachtet werden (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). Klinische und labordiagnostische Hinweise auf Blutungen in Form einer erhöhten Blutungsneigung, veränderter Gerinnungsparameter oder ein Sinken des Gesamtproteins lagen nicht vor. Ein Absinken des Hämatokritwertes durch eine Verminderung der Erythropoese erscheint als auslösende Ursache ebenfalls unwahrscheinlich. Da die Reifung von Erythrozyten eine Zeitspanne von etwa 7 Tagen umfasst, würde sich eine herabgesetzte Erythropoese erst nach zirka einer Woche auf den Hämatokritwert auswirken. Der Abfall des Wertes trat in der vorliegenden Untersuchung jedoch bereits innerhalb von 24 – 72 Stunden nach der ersten Injektion auf.

2. Abfall der Leukozytenzahl

Bei allen Patienten des Vorversuchs wurde innerhalb der ersten 48 Stunden nach der ersten Injektion ein deutlicher Abfall der Gesamtleukozytenzahl beobachtet. Eine Ursache konnte bisher nicht eindeutig gefunden werden. Da bei 2 Patienten (Patient Nr. 1 und Nr. 2) die Werte im weiteren Verlauf nach einem raschen Anstieg erneut auf ihr ursprüngliches Niveau absanken, entspricht der Verlauf dieser Kurven der biologischen Leukozytenkurve nach Schilling, wie sie im Rahmen von Infektionskrankheiten auftritt. Abfall, Anstieg und erneuter Abfall der Werte entsprechen den Phasen der „Depression“, der „Linksverschiebung“ und der „Kampf- und Überwindungsphase“. Das Auftreten von stabkernigen Leukozyten ab dem 2. Tag der Behandlung und eine gleichzeitige Entwicklung einer Lymphopenie bei beiden Patienten unterstreichen diese Vermutung. Ob diese Entwicklung durch eine vermehrte Auseinandersetzung des Organismus mit freigesetzten Erreger resultiert bleibt jedoch unklar. Möglicherweise kann der Abfall der Gesamtleukozytenzahl auch aus der Migration der Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das Gewebe im Injektionsstellenbereich als entzündliche Reaktion auf die Wirkstoffapplikation resultieren. Nach initialer Leukozytendepression kommt es zu einem erneuten Anstieg von Leukozyten nach Mobilisierung von Reserven aus dem Knochenmark. Schwellungen der Injektionsstellen waren klinisch allerdings erst ab dem 3. Tag der Therapie zu verzeichnen. Aus welchem Grund die Werte bei Patient Nr. 3 nach dem initialen Abfall dauerhaft erniedrigt blieben, konnte nicht geklärt werden. Auch zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung 6 Wochen nach Beendigung der Therapie lag bei diesem Patienten die Gesamtleukozytenzahl unter dem Normbereich. Eine depressive Wirkung des Präparates auf das Knochenmark kann in diesem Zusammenhang zwar nicht sicher ausgeschlossen werden, erscheint aber auf Grund des raschen Absinkens der Werte unwahrscheinlich. Da die Bildung und Reifung von Leukozyten 6 Tage dauert, würde sich eine Knochenmarkdepression erst nach diesem Zeitraum im Blutbild widerspiegeln.

3. Anstieg der Thrombozytenzahl

Positiv kann der Verlauf der Thrombozytenzahlen unter dem Einfluß der Therapie gewertet werden. 2 Patienten (Patient Nr. 1 und Nr. 2), bei denen zu Beginn der Behandlung eine Thrombozytopenie diagnostiziert wurde, zeigten einen deutlichen

und kontinuierlichen Anstieg der Werte bis in den Normbereich. Eine positive Beeinflussung der Megakaryopoese könnte eine mögliche Ursache sein. Die Entwicklung einer Thrombozytose durch eine pathologisch gesteigerte Megakaryopoese wurde dagegen nicht beobachtet.

4. Signifikanter Abfall der MPC bei hierzu parallel verlaufenden Anstieg der PCDW

Da Thrombozyten im Rahmen ihrer Aktivierung degranulieren, stellt die Abnahme der Granularität und der damit einhergehende Abfall der MPC ein Kennzeichen aktivierter Blutplättchen dar (MORITZ et al., 2003). Das deutliche Absinken der MPC über den Behandlungszeitraum scheint somit auf einer Aktivierung der Blutplättchen im Rahmen der Therapie zu beruhen. Ein gleichzeitiger Abfall der PCDW, die ein Maß für die Variation in der Granularität der Thrombozytenpopulation darstellt, wäre beweisend für die Aktivierung des überwiegenden Anteils der Thrombozytenpopulation. Im vorliegenden Fall steigt jedoch der PCDW bei sinkender MPC. Dies könnte auf eine Aktivierung eines Teils der Thrombozytenpopulation deuten.

Obwohl der deutliche Anstieg der Thrombozyten unter dem Einfluß von Ol-PC auf eine gute klinische Wirksamkeit bei Patienten mit einer Thrombozytopenie hinweist, muß der deutliche Abfall der Erythrozyten und Leukozyten, welche zum Teil unter den Referenzbereich sinken, kritisch bewertet werden. Insbesondere bei Patienten, die im Rahmen der kaninen Leishmaniose an einer Anämie oder Leukozytopenie leiden, müssen diese unerwünschten Wirkungen als nicht tolerierbar eingestuft werden. Daher erfolgte im Anschluß an den Vorversuch eine Modifikation des Präparates. Die Art der Modifikation kann aus patentrechtlichen Gründen nicht angegeben werden.

Im Anschluß soll nun die Auswertung der Befunde für die Patientengruppen A und B diskutiert werden. Bei der Auswertung der Befunde muß beachtet werden, dass zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung in der Gruppe B nur 3 Tiere vorgestellt wurden. Insbesondere bei signifikanten Wechselwirkungen zwischen den beiden Gruppen und der Zeit kann dies zu einer Beeinflussung des Ergebnisses führen. Diese Befunde sind somit nur eingeschränkt beurteilbar.

In beiden Patientengruppen konnte eine signifikante Zunahme der Erythrozytenzahlen, des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten und des Hämatokritwertes über den Zeitraum von Behandlungsbeginn bis zur Kontrolluntersuchung 6 Wochen nach Beendigung der Therapie festgestellt werden. Der Anstieg dieser Werte ist wahrscheinlich auf den wachstumsfördernden Effekt von Alkylphosphocholinen auf die Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems zurückzuführen, der in Untersuchungen von JENDROSSEK und HANDRICK (2003) nachgewiesen werden konnte. Da Anämien bei leishmaniosekranken Patienten in der Regel nicht-regenerativ und als Begleitanämien chronischer Erkrankungen zu bewerten sind, liegt außerdem die Vermutung nahe, dass eine Besserung des Krankheitszustandes zu einer Erholung der Hämatopoese führen kann. Die in Kapitel 4.5.2 beschriebene Beobachtung einer verminderten prozentualen Häufigkeit der herabgesetzten Erythropoese in der Patientenpopulation unterstreicht die oben genannten Vermutungen.

Ein deutlicher Abfall des Hämatokritwertes, wie er bei den Patienten des Vorversuchs festgestellt wurde, konnte in den Patientengruppen A und B nur in Einzelfällen beobachtet werden.

Die statistische Auswertung der Gesamtleukozytenzahl ergab einen signifikanten Anstieg der Werte über den Zeitraum von Behandlungsbeginn bis zur Kontrolluntersuchung. Unter Berücksichtigung des Differentialblutbildes beruht der Anstieg der Leukozyten auf einem signifikanten Anstieg von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im selben Zeitraum. Auch hier ist der stimulierende Effekt von Alkylphosphocholinen auf die Hämatopoese als Ursache für diese Veränderungen in Betracht zu ziehen (JENDROSSEK und HANDRICK, 2003). Im Rahmen der kaninen Leishmaniose treten Leukozytopenien in Folge von Störungen der Zellreifung und Differenzierung durch die Infektion des Knochenmarkes auf. Somit ist es zudem wahrscheinlich, dass eine Reduktion der Erregerzahl zu einer Normalisierung der Myelopoese führen kann. Der langsame Anstieg der Werte und der im Knochenmark zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung festgestellte verringerte prozentuale Anteil von Patienten mit einer herabgesetzten Myelopoese unterstützen diese Vermutungen. Ferner könnte der Anstieg der neutrophilen Granulozyten durch eine Reaktion des Wirtsorganismus auf eine erhöhte Anzahl freigesetzter Erreger im Rahmen der Therapie begünstigt werden oder im Zusammenhang mit einer entzündlichen Reaktion im Injektionsstellenbereich auftreten. In diesem Fall wäre jedoch ein Anstieg der Werte über den Zeitraum der Behandlung und ein rasches Absinken der Werte nach Therapieende (z.B. mit dem Rückgang der Schwellungen im Bereich der Applikationsstelle) zu erwarten gewesen. Für den Anstieg der eosinophilen

Granulozyten müssen ebenfalls weitere Ursachen in Betracht gezogen werden. So kann auch hier eine vermehrte Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Erregern unter dem Einfluß der Therapie zu einer Erhöhung dieser Werte führen. Ferner wird ein vermehrtes Auftreten von eosinophilen Granulozyten im Rahmen der Heilungsphase einer Infektion oder Entzündung beobachtet. Die Erhöhung eosinophiler Granulozyten im Rahmen einer allergischen Reaktion wäre ebenfalls denkbar. Jedoch ist dies auf Grund einer hohen Zahl betroffener Patienten eher als unwahrscheinlich anzusehen.

Der Abfall der Gesamtleukozytenzahl innerhalb von 48 Stunden nach der ersten Injektion des Präparates konnte im Gegensatz zum Vorversuch bei den Patienten der Gruppe A und B nicht festgestellt werden.

Hinweisend auf eine gute Wirksamkeit von Ol-PC scheint auch der signifikante Anstieg von Thrombozyten zu sein. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls ein verringerter prozentualer Anteil von Patienten mit herabgesetzter Megakaryopoese bei der zytologischen Untersuchung des Knochenmarkes zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung nachgewiesen werden. Gegebenenfalls vermag auch hier – neben einem knochenmarksstimulierenden Effekt des Wirkstoffes (JENDROSSEK und HANDRICK, 2003) - eine Verringerung der Erregerdichte im Knochenmark zu einer Erholung der Megakaryopoese führen. Im Rahmen der Infektion des Knochenmarkes treten bei leishmaniosekranken Hunden auch Bildungs- und Reifungsstörungen in der thrombozytären Zellreihe auf, die sich in Thrombozytopenien äußern können.

Ob der Abfall der PCDW innerhalb der ersten 7 Tage der Behandlung ein Hinweis auf die Aktivierung einiger Thrombozyten ist, bleibt unklar. Im Gegensatz zum Vorversuch konnte in den Behandlungsgruppen A und B jedenfalls keine signifikante Abnahme der MPC festgestellt werden.

Die Überwachung der Nierenfunktion unter dem Einfluß von Ol-PC basierte neben der Bestimmung von Harnstoff und Kreatinin sowie den Elektrolyten Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid und Phosphor im Blutplasma auch auf der Bestimmung des Protein-Kreatinin-Quotienten im Urin. Die Wirksamkeit des Präparates bei Patienten mit einer bereits bestehenden Schädigung des Nierenparenchyms kann in der vorliegenden Untersuchung nur eingeschränkt beurteilt werden. Die zu geringe Zahl betroffener Tiere ($n = 3$) erlaubt nur eine deskriptive Auswertung der Daten. Da bei den betroffenen Patienten neben einer massiven

Erhöhung der Nierenparameter außerdem deutliche klinische Anzeichen einer Urämie vorlagen, wurden bei diesen Tieren neben der Verabreichung von Ol-PC auch Infusionstherapien durchgeführt. Diese begleitenden intensiv-medizinischen Maßnahmen erschweren die Interpretation der Befunde. Während bei Patient Nr. 5 die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin im Blutplasma unter der Therapie unverändert blieben, konnte bei den Patienten Nr. 7 und Nr. 23 eine Abnahme der Konzentrationen verzeichnet werden. Allerdings erreichten die Werte bei keinem Tier den Referenzbereich. Außerdem konnte bei den Patienten keine anhaltende Stabilisierung des Allgemeinbefindens erzielt werden, so dass die Hunde in einem Zeitraum von bis zu 3 Wochen nach Therapieende schmerzlos eingeschläfert werden mussten. Da im Rahmen der kaninen Leishmaniose eine Immunkomplexglomerulonephritis vorliegt, ist eine rasche Besserung der klinischen und labordiagnostischen Veränderungen nicht zu erwarten. Eine weitere negative Beeinträchtigung des bereits vorgeschädigten Nierenparenchyms scheint zumindest nicht vorzuliegen. Bei keinem Patienten mit einer dekompensierten chronischen Niereninsuffizienz war eine Verschlechterung der Werte unter dem Einsatz von Ol-PC zu verzeichnen.

Obwohl die statistische Auswertung der Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin in den Patientengruppen A und B über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Veränderungen aufwies, lässt sich ein gewisses nephrotoxisches Potential des Präparates nicht sicher ausschließen, da ein signifikanter Anstieg des Protein-Kreatinin-Quotienten im Urin festgestellt wurde. In diesem Zusammenhang fehlen allerdings die Ergebnisse von Langzeituntersuchungen. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Veränderungen des Protein-Kreatinin-Quotienten nur innerhalb des Behandlungsintervalls überprüft. Ob die Werte nach Beendigung der Therapie weiterhin erhöht bleiben oder sich rasch normalisieren, ist bisher nicht bekannt. Da es sich bei Alkylphosphocholinen um Wirkstoffe handelt, die unter anderem die Permeabilität von Membranen zu beeinflussen scheinen (JENDROSSEK und HANDRICK, 2003), könnten für mögliche nephrotoxische Eigenschaften ähnliche Mechanismen wie bei Amphotericin B ursächlich in Frage kommen. Amphotericin B beeinflusst ebenfalls die Permeabilität von Zellmembranen und wirkt in diesem Zusammenhang aufgrund einer Beeinträchtigung der glatten Muskulatur am Tubulussystem und Gefäßsystem nephrotoxisch (SAWAYA et al., 1995).

Die Elektrolyte weisen zwar unter dem Einfluß der Therapie einige signifikante Veränderungen insbesondere bezüglich der Wechselwirkung zwischen Gruppe und Zeit auf, jedoch befinden sie sich über den gesamten Zeitraum im Referenzbereich und hängen zudem

deutlich vom Hydratationszustand des Patienten ab. Daher scheinen diese Befunde insgesamt vernachlässigbar.

Mit Ausnahme des Albumins zeigen weder die Parameter der Leberfunktion noch die Parameter der Leberzellschädigung unter dem Einfluß der Therapie mit Ol-PC eine signifikante Veränderung. Ein hepatotoxisches Potential scheint somit für den Wirkstoff nicht vorzuliegen. Da jedoch kein Patient mit einer bereits bestehenden Leberparenchymschädigung zur Therapie vorgestellt wurde, liegen keine Hinweise vor, wie sich das Präparat auf eine vorgeschädigte Leber auswirken könnte. Als positiv ist der signifikante Anstieg von Albumin in den beiden Patientengruppen im Zeitraum von Behandlungsbeginn bis 6 Wochen nach dem Therapieende zu bewerten, da viele leishmaniosekrankte Patienten an einer erniedrigten Konzentration von Albumin im Blutplasma leiden. Ursache kann neben einem nephrotischen Verlustsyndrom auch ein Verlust von Protein über den Darm infolge einer chronischen Entzündung sein. Darüber hinaus handelt es sich bei Albumin um ein sogenanntes „negatives Akut-Phase-Protein“. Im Gegensatz zu den Akut-Phase-Proteinen C-reaktives Protein und Haptoglobin erfolgt unter dem Einfluß von IL-6 eine Reduktion der Albuminsynthese in den Hepatozyten (CASTELL et al., 1989). Nach Rückgang der Entzündungssymptomatik kann sich die Albuminkonzentration im Blutplasma langsam normalisieren. Letzteres scheint ursächlich für den allmählichen Anstieg des Wertes am wahrscheinlichsten zu sein. Eine verringerte Ausscheidung von Albumin über die Niere erscheint im Zusammenhang mit einem signifikanten Anstieg des Protein-Kreatinin-Quotienten im Urin unwahrscheinlich.

Die Aktivitäten der Pankreasenzyme Amylase und Lipase stiegen unter der Therapie mit Ol-PC nicht an.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich eine gute Wirksamkeit von Ol-PC zur Behandlung labordiagnostischer Veränderungen im Rahmen der kaninen Leishmaniose folgern. Mit Ausnahme eines erhöhten Protein-Kreatinin-Quotienten fielen keine Nebenwirkungen bezüglich Hämatologie und Blutchemie auf. Ferner konnte bewiesen werden, dass die beobachteten klinischen Nebenwirkungen nicht mit einer Veränderung der Organparameter im Blutbild einhergehen.

5.5 Mikroskopischer Erregernachweis und PCR

Im Interesse der eigenen Untersuchungen stand neben der klinischen Wirksamkeit und der Überprüfung möglicher Nebenwirkungen insbesondere die Frage, ob durch eine Therapie leishmaniosekranker Hunde mit Ol-PC eine Erregerfreiheit im Knochenmark erzielt werden kann. Gelingt der Nachweis von Parasiten nach Therapie nicht mehr, so kann dies bei gleichzeitigem Ausbleiben der Symptomatik, möglicherweise als Heilung eingestuft werden. Dies ist insbesondere von Interesse, da der Einsatz von Hexadecylphosphocholin zur Behandlung der viszerale Leishmaniose beim Menschen in bisherigen Studien zu Heilungsraten von bis zu 98 % geführt hat (JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 1999; MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). In den Untersuchungen der Humanmedizin wurde hierzu die mikroskopische Untersuchung von Milzaspiraten 6 Monate nach der Behandlung herangezogen. Neben einem negativen Parasitennachweis durfte bei den Patienten kein Rezidiv aufgetreten sein. In den eigenen Untersuchungen wurde eine PCR zum direkten Nachweis der Erreger aus Knochenmarkpunktaten eingesetzt, da die PCR im Vergleich zur Zytologie eine höhere Sensitivität aufweist (PIARROUX et al., 1994; GRADONI, 2002). Dies verdeutlichen beispielsweise 3 Patienten (Hunde Nr. 13, 14 und 15), bei denen mittels mikroskopischer Untersuchung keine Differenzierung zwischen intrazytoplasmatisch gelegenen Parasiten oder phagozytierten Bestandteilen anderer Herkunft möglich war. Hier konnte nur das positive Ergebnis der PCR die Diagnose sichern. Nur in zwei Fällen (Patient Nr. 22 und 24) waren die Knochenmarkzytologien zur Diagnosestellung ausschlaggebend.

Da bei allen Patienten vor Therapiebeginn eine Leishmaniose diagnostiziert wurde ($n = 27$ oder 100 %), gibt der Anteil der positiven Tiere in Bezug auf die verschiedenen Diagnoseverfahren die Sensitivität der Methoden wieder. Diese beträgt für die zytologische Untersuchung 70,4 %. Diese Beobachtung spiegelt sich in der Literatur wieder, in der die Sensitivität für Knochenmarkzytologien mit 50 – 70 % angegeben wird (NOLI, 1999). Die Sensitivität für die PCR betrug in den eigenen Untersuchungen lediglich 88,0 %. Diese sollte nach Literaturangaben nahezu 100 % betragen (ASHFORD et al., 1995; MATHIS und DEPLAZES, 1995; ROURA et al., 1999). Als mögliche Ursachen kommen hierfür beispielsweise die Verwendung „ungeeigneter“ Primer (bei Infektion mit einer anderen Erregerart) oder eine deutliche Kontamination des Knochenmarkes mit peripherem Blut in Betracht, welche über eine Reduktion der Erregerdichte zu einem erschwerten Nachweis der Parasiten führt (FISA et al., 2001).

Bei dem Nachweis von Leishmanien im Knochenmark ergaben sich in Einzelfällen folgende Schwierigkeiten:

1. Patient Nr.3 wies vor der Therapie sowohl ein negatives zytologisches Ergebnis als auch einen negativen PCR-Befund im Knochenmarkpunktat auf. Diese Befunde müssen jedoch ebenso wie das negative zytologische Ergebnis nach der Therapie als falsch-negativ beurteilt werden, da nach der Therapie ein positiver PCR-Befund vorlag. Eine Reinfektion nach erfolgter Therapie kann in diesem Zusammenhang nahezu sicher ausgeschlossen werden, da ein Aufenthalt in endemischen Gebieten im entsprechenden Zeitraum nicht stattfand. Als Ursache der falsch-negativen Befunde muß wahrscheinlich eine Durchmischung des Aspirates mit peripherem Blut bei der Probengewinnung angesehen werden. Die Proben des Patienten wiesen bei der mikroskopischen Beurteilung einen hohen Anteil peripheren Blutes bei geringer Anzahl von Stammzellen auf. Differentialdiagnostisch kommt in diesem Zusammenhang ein aregenerativer Zustand des Knochenmarkes bezüglich aller Zellreihen in Frage. Dies ist allerdings wegen fehlender gravierender Blutbildveränderungen höchst unwahrscheinlich. Trotz wiederholter Punktion konnte leider kein geeigneteres Probenmaterial gewonnen werden. Aufgrund geringerer Erregermengen erweist sich der Nachweis von Parasiten im peripheren Blut als schwieriger (FISA et al., 2001). Zur Optimierung der Ergebnisse bei Probenmaterial mit geringer Erregerdichte könnte eine „Nested-PCR“ oder eine kulturelle Anzüchtung der Erreger in einem geeigneten Nährmedium in Betracht gezogen werden (PIARROUX et al., 1994; MATHIS und DEPLAZES, 1995; FISA et al., 2001; GRADONI, 2002). Neben dem Erregernachweises ist auch die Bewertung der Blutzellbildung bei Patient Nr. 3 nur eingeschränkt möglich. Auf Grund der Kontamination der Proben mit peripherem Blut lagen nur wenige Stammzellen zur Beurteilung der Hämatopoese vor.
2. Zwei Patienten (Hunde Nr. 22 und 24) waren vor der Therapie bei positiven zytologischen Befunden durch negative Ergebnisse in der PCR gekennzeichnet. Die Befunde der PCR müssen somit als falsch-negativ bewertet werden. Ein negatives PCR-Ergebnis bei positiver Zytologie könnte beispielsweise durch die Infektion der Patienten mit einer anderen Erregerart als *L. infantum* verursacht sein. Da im vorliegenden Fall beide Hunde aus dem südlichen Europa stammen (Spanien bzw.

Portugal) kann eine Infektion mit *L. tropica* vorliegen. Dieser Erreger ist neben *L. infantum* ebenfalls in der Alten Welt vertreten (NOLI, 1999). Da die Primer auf spezifischen DNA-Sequenzen für *L. infantum* basieren, könnte das Erbgut von *L. tropica* nicht mittels PCR vervielfältigt und in der sich anschließenden Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Während Patient Nr. 24 nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurde, wies Patient Nr. 22 auch nach der Therapie ein negatives PCR-Ergebnis auf. Zu diesem Zeitpunkt erbrachte allerdings auch die Zytologie einen negativen Befund, so dass hier die Differenzierung zwischen einem falsch-negativen und richtig-negativen Befund nicht möglich ist. Eine PCR mit spezifischen Primern für *L. tropica* wurde im vorliegenden Fall nicht durchgeführt.

Da kein Patient nach der Therapie erneut in endemische Gebiete verbracht wurde, ist eine Reinfektion nach Erregerelimination auf Grund der Therapie mit Ol-PC und eine damit verbundene Beeinflussung der Ergebnisse ausgeschlossen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Humanmedizin scheint durch die Therapie leishmaniosekranker Hunde mit Ol-PC keine Heilung erzielbar zu sein. Die Ergebnisse der Gruppe A und die gruppenübergreifende Auswertung zeigen keine signifikant erhöhten Heilungsraten. Nur bei einem Patienten (Hund Nr. 27) lag bei positivem PCR-Befund vor der Therapie ein negatives PCR-Ergebnis nach der Therapie vor. Allerdings zeigte dieser Patient trotz negativem PCR-Befund bereits nach 3 Wochen eine sich erneut verschlechternde Symptomatik. Obwohl eine autoimmune Komponente der Symptomatik bei diesem Hund bisher nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, muß eine Heilung wohl eher als unwahrscheinlich angesehen werden. Eine Ursache für die differierenden Heilungserfolge in der Human- und Veterinärmedizin ist zur Zeit noch nicht bekannt. Mögliche Ursache könnte unter anderem die unterschiedliche Applikationsform der Wirkstoffe sein. Insbesondere durch die orale Verabreichung von Hexadecylphosphocholin werden beim Menschen hohe Wirkstoffspiegel vor allem in Leber und Milz, also in Organen mit einer hohen Parasitendichte, erzielt (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, 2000). Ob die subkutane Injektion von Ol-PC einen ausreichenden Wirkstoffspiegel im Knochenmark zu erzielen vermag, ist bisher nicht geklärt. Darüber hinaus erfolgt die Applikation des Präparates in der Humanmedizin über einen längeren Zeitraum. Während bei den Hunden in den eigenen Untersuchungen maximal 9 Injektionen des Wirkstoffes verabreicht wurden, erfolgte die Behandlung leishmaniosekranker Menschen in den

bisherigen Studien in der Regel über einen Zeitraum von 28 Tage (JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 1999).

Obwohl unter den vorgegebenen Behandlungsbedingungen keine vollständige Heilung durch den Einsatz von Ol-PC erzielbar scheint, fällt ein verminderter prozentualer Anteil zytologisch positiver Patienten nach der Therapie auf. Während vor der Therapie bei 70,4 % der Patienten Parasiten mikroskopisch im Knochenmark nachgewiesen werden konnten, beträgt der Anteil eindeutig zytologisch positiver Tiere nach der Therapie nur noch 25,0 %. Diese Beobachtung weist auf eine deutliche Verringerung der Parasitendichte und damit auf eine gute klinische Wirksamkeit des Präparates hin. Die Reduktion der Erregerzahl kann eine zytologische Diagnosestellung erschweren (CIARAMELLA et al., 1997) und auf diese Weise gegebenenfalls zu einem erhöhtem Anteil falsch-negativer Patienten bei der Auswertung zytologischer Präparate nach der Therapie geführt haben.

Ferner konnte beobachtet werden, dass sich der prozentuale Anteil der Patienten mit einer verminderten Hämatopoese nach der Therapie verringert hat. Da sich diese Veränderungen im Blutbild der Patienten durch einen signifikanten Anstieg verschiedener Zellreihen nach der Therapie widerspiegeln, unterstreicht diese Beobachtung die klinische Wirksamkeit des Präparates.

5.6 Die Behandlung der kaninen Leishmaniose mit Oleyl-Phosphocholin im Vergleich mit N-Methylglucamin-Antimoniats (Glucantime[®], Rhône Mérieux)

In diesem Abschnitt sollen wesentliche Aspekte der Therapie leishmaniosekranker Hunde mit Ol-PC und dem 5-wertigen Antimonpräparat Glucantime[®], dem derzeitigen Mittel der Wahl zur Behandlung der kaninen Leishmaniose diskutiert werden. Hierzu zählt neben einem Vergleich der klinischen Wirksamkeit, der Remissionszeit und der Nebenwirkungen auch der Gesichtspunkt der Erregerelimination durch die Therapie und die Gefahr von Resistenzbildungen. Außerdem sollen allgemeine Aspekte zur Durchführbarkeit der Therapie – wie z.B. Applikationsform und Behandlungsdauer, Kosten und Verfügbarkeit des Präparates – berücksichtigt werden.

Da es sich sowohl bei Glucantime[®] als auch bei Ol-PC um einen Wirkstoff handelt, der subkutan appliziert werden kann, erweist sich die Anwendung beider Präparate als einfach. Beide Wirkstoffe werden in Form von „Kuren“ über ein längeres Behandlungsintervall verabreicht. Die Dauer dieses Behandlungsintervalls kann bei Glucantime[®] zwischen einigen Tagen und mehreren Wochen in unterschiedlichen Dosierungen variieren (DENEROLLE und BOURDOISEAU, 1999; LAMOTHE, 1999; MORITZ et al., 1999; BANETH, 2002). Jedoch sollten Länge der Behandlung und Höhe der Dosierung so gewählt werden, dass Resistenzbildungen nicht gefördert werden (ALEXANDER et al., 2002). Die Behandlung mit Ol-PC umfasst zum momentanen Zeitpunkt maximal 9 Injektionen. Gegebenenfalls sollte jedoch zur Verbesserung der klinischen Wirksamkeit und vor allem zur Verlängerung der Remissionszeit eine Ausdehnung des Therapieintervalls in Betracht gezogen werden. Ergebnisse von Untersuchungen über die Verabreichung von Ol-PC über einen längeren Zeitraum liegen zur Zeit noch nicht vor.

Ol-PC wurde im Rahmen der vorliegenden Studie in einem genehmigten Tierversuch eingesetzt und ist kommerziell noch nicht verfügbar. Jedoch ergeben sich für den praktizierenden Tierarzt auch beim Bezug von N-Methyl-Glucamin Schwierigkeiten, da das Präparat nicht in Deutschland zugelassen ist und daher über eine internationale Apotheke bezogen werden muß (GOTHE, 1991).

Im Gegensatz zu Glucantime[®] scheinen beim Einsatz von Ol-PC nach bisherigen Erkenntnissen keine kontinuierlichen Kontrollen des Blutbildes während der Behandlung notwendig zu sein, da weder hämatologische noch blutchemische Parameter eine negative Beeinflussung unter Therapie aufwiesen. Die im Rahmen der Therapie beobachteten gastrointestinalen Nebenwirkungen könnten jedoch in Abhängigkeit vom Schweregrad im Einzelfall eine Kontrolle des Elektrolyt- und Säurebasehaushaltes erforderlich werden lassen. Dies gilt jedoch ebenso bei entsprechender Symptomatik beim Einsatz von N-Methyl-Glucamin.

Ein weiterer Vorteil von Ol-PC könnte in der einfachen Molekülstruktur des Wirkstoffes liegen, die eine kostengünstige Produktion und damit niedrige Behandlungskosten ermöglichen könnte. Dies ist zumindest bei dem strukturell sehr eng verwandten Wirkstoff Hexadecylphosphocholin der Fall (MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE

CHEMIE, 2000). Bei der Therapie leishmaniosekranker Hunde mit Glucantime[®] ergeben sich dagegen häufig hohe Behandlungskosten (GOTHE, 1991; LAMOTHE, 1999).

In einer Untersuchung von MORITZ et al. (1999) wurden 6 Hunde mit Glucantime[®] behandelt, die bereits in den ersten 10 Tagen nach Beginn der Therapie eine deutliche Reduktion der klinischen Symptomatik zeigten. Eine Symptommfreiheit kann dann bei den meisten Tieren innerhalb weniger Wochen erzielt werden (SLAPPENDEL, 1988). Bei einigen Patienten stellt sich ein Therapieerfolg jedoch erst nach einer längeren Behandlungsdauer ein. So zeigten zwar 85,4 % von 41 leishmaniosekranken Patienten in einer Studie von SLAPPENDEL et al. (1997) eine Besserung der klinischen Symptomatik, diese trat bei einigen Patienten aber erst nach 6-wöchiger Therapie ein. Beim Einsatz von Ol-PC ist ein Rückgang der Symptomatik ebenfalls einige Tage nach Beginn der Behandlung zu verzeichnen. Nach Beendigung der Therapie konnte bei einigen Patienten innerhalb der folgenden Tage und zum Teil Wochen eine sich kontinuierlich verbessernde Symptomatik festgestellt werden. Eine Ursache für diese Beobachtung wurde bisher nicht gefunden.

In der Literatur wird eine gute Reduktion aller Symptome bei der Therapie leishmaniosekranker Hunde mittels Glucantime[®] beschrieben (SLAPPENDEL, 1988; MORITZ et al., 1999). In der vorliegenden Studie wurde zur Erfassung der klinischen Wirksamkeit von Ol-PC unter anderem die Summe aller klinischen Symptome gebildet und diese hinsichtlich signifikanter Änderungen überprüft. Hierbei konnte sowohl in Gruppe A (8 Injektionen in einer Dosierung von 7,0 µmol/kg) als auch in Gruppe B (9 Injektionen in einer Dosierung von 5,3 µmol/kg) eine signifikante Besserung in der Gesamtheit aller klinischen Symptome verzeichnet werden. Charakteristische labordiagnostische Veränderungen im Blutbild leishmaniosekranker Hunde (Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie und Hypoalbuminämie) zeigten unter der Therapie mit Ol-PC ebenfalls eine signifikante Besserung. Hierzu zählte neben einem Anstieg der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten und des Hämatokritwertes auch eine Zunahme der Gesamtleukozytenzahl, der Thrombozyten und des Albumins.

Ebenso wie bei Glucantime[®] erscheint die Wirksamkeit des Präparates bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz deutlich eingeschränkt (SLAPPENDEL, 1988; GOTHE, 1991; SLAPPENDEL und TESKE, 1997). Während der Einsatz von Glucantime[®] bei Tieren mit einer eingeschränkten Nierenfunktion allerdings auf Grund der Nephrotoxizität des

Wirkstoffes abgelehnt werden sollte (STEUBER und KROKER, 2002), konnte unter Verwendung von Ol-PC kein Anstieg der Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Blutplasma beobachtet werden. Jedoch wurde ein signifikanter Anstieg des Protein-Kreatinin-Quotienten im Urin der behandelten Patienten festgestellt, so dass auch hier eine Schädigung der Niere durch den Wirkstoff gegebenenfalls in Betracht gezogen werden muß. Bei gleichzeitiger Infusionstherapie zeigten die 3 Patienten der Studie mit einer dekompensierten chronischen Niereninsuffizienz (Patient Nr. 5, 7 und 23) zwar keinen deutlichen Anstieg der Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Blutplasma, aber es konnte keine dauerhafte Stabilisierung der Tiere erreicht werden. Die betroffenen Patienten mussten während der Therapie oder in einem Zeitraum von bis zu 3 Wochen nach der Therapie schmerzlos eingeschläfert werden.

SLAPPENDEL (1988) beobachtet beim Einsatz von N-Methyl-Glucamin außerdem eine eingeschränkte Wirksamkeit bei Patienten, die im Rahmen der Leishmaniose eine deutliche Schädigung der Leber oder schwere Symptome des Magen-Darm-Traktes aufwiesen. Da in den eigenen Untersuchungen keine Patienten mit einer Hepatopathie oder hochgradigen gastrointestinalen Symptomen zur Behandlung vorgestellt wurden, ist die Wirksamkeit von Ol-PC in diesem Zusammenhang leider nicht bekannt. Jedoch konnte weder ein Anstieg der Leberenzyme noch der Leberfunktionsparameter im Blutplasma bei den Patienten beobachtet werden. Eine Hepatotoxizität scheint somit nach den bisherigen Beobachtungen nicht vorzuliegen. Auf den Einsatz von Glucantime[®] sollte dagegen auf Grund des hepatotoxisches Potential des Präparates bei Patienten mit einer bereits bestehenden Leberparenchymschädigung verzichtet werden (STEUBER und KROKER, 2002).

Von Bedeutung bei der Bewertung der klinischen Wirksamkeit eines Präparates erscheint auch der prozentuale Anteil der Patienten, die nicht auf die Therapie angesprochen haben. In einer Untersuchung von SLAPPENDEL et al. (1997) an 41 Hunden zeigten 14,6 % der Tiere – zum Teil nach mehrwöchiger Behandlung mit N-Methyl-Glucamin - keine Besserung der klinischen Symptomatik. In diese Untersuchung wurden keine Patienten mit einer bereits bestehenden chronischen Niereninsuffizienz aufgenommen. In den eigenen Untersuchungen zeigten 14,8 % (n = 4) der Hunde keine Besserung der krankheitsbedingten Veränderungen. Zu diesen Patienten zählten neben einem Therapiewiederholer (Hund Nr. 20) zwei Tiere mit einer dekompensierten chronischen Niereninsuffizienz (Hund Nr. 6 und 23) und ein Tier (Patient Nr. 12), der auf Grund einer Infektion mit Ehrlichia canis eine hochgradige Thrombozytopenie aufwies.

In einer Dosierung von 50 mg/kg KGW soll eine einmalige Injektion von N-Methyl-Glucamin Hunden einen 14-tägigen Schutz vor einer Infektion mit Leishmanien bieten. Ob eine prophylaktische Wirkungsweise für Ol-PC vorliegt, muß erst in weiterführenden Studien untersucht werden. Bisher liegen diesbezüglich keine Ergebnisse vor.

Nach Abschluß einer Behandlung mit Glucantime® ist mit dem erneuten Auftreten von Symptomen nach einigen Monaten bis zu einem Jahr zu rechnen (SLAPPENDEL, 1988). Wie in zahlreichen Studien beschrieben wird, rezidivieren die meisten Patienten in der Regel nach 6 Monaten (GOTHE, 1991; SLAPPENDEL und TESKE, 1997; MORITZ et al., 1999; NOLI, 1999). In einer Untersuchung von SLAPPENDEL et al. (1997) traten bei 75 % der mit Glucantime® behandelten Patienten erneut Krankheitsanzeichen innerhalb des ersten Jahres auf. Eine Kombination mit Allopurinol vermag die Rezidivrate allerdings zu senken (NOLI, 1999). Obwohl die meisten Patienten gut auf eine Behandlung mit Ol-PC ansprachen, traten bei vielen Patienten innerhalb kurzer Zeit erneut Symptome auf. Während 50 % der Patienten der Gruppe A bereits nach 4 Wochen erneut eine deutliche Symptomatik zeigten, lagen bei 50 % der behandelten Tiere aus der Gruppe B nach 7 Wochen wieder deutliche Krankheitsanzeichen vor. 75 % der Hunde rezidierten in Gruppe A bereits innerhalb von 17 Wochen und in Gruppe B innerhalb von 31 Wochen nach Therapieende. In 7 Fällen wurde Allopurinol nach Therapieende bei den Patienten eingesetzt. Die Einzeltierbefunde, die über den genauen Zeitpunkt der Verabreichung von Allopurinol bei den betreffenden Hunden informieren, sind in der Tabelle 30 des Anhangs aufgeführt. Obwohl der Einsatz von Allopurinol die Aussagekraft der Befunde bezüglich der Remissionszeit maßgeblich beeinflussen könnte, wurde auf die Gabe zugunsten des Wohl des Tieres nicht verzichtet. Die kurzen medianen Remissionszeiten in beiden Behandlungsgruppen lassen außerdem eine übermäßig positive Beeinflussung der Befunde durch die Gabe von Allopurinol unwahrscheinlich erscheinen. Auffällig sind jedoch die Befunde von 3 Patienten der Gruppe A (Hund Nr. 10, 14 und 15). Diese Tiere zeigten durch die Therapie mit Ol-PC eine gute Besserung ihrer klinischen Symptome. Auch 6 Wochen nach der Entlassung zeigten die Patienten ein stabiles Allgemeinbefinden und keine Symptome der Erkrankung. In Absprache mit den Besitzern wurde in diesen Fällen der Einsatz von Allopurinol beschlossen, um das Auftreten eines erneuten Rezidivs gegebenenfalls verzögern zu können. Alle 3 Hunde wiesen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes keine erneuten Symptome der Erkrankung auf. Ob eine signifikante Verlängerung der symptomfreien Zeit nach Therapie mit Ol-PC durch eine Kombinationstherapie mit Allopurinol erzielt werden kann, ist zur Zeit noch nicht bekannt.

Da viele Patienten im Rahmen der Leishmaniose schwerwiegende Krankheitsanzeichen aufweisen, die zum Teil mit einer deutlichen Einschränkung von Organfunktionen einhergehen, sollte zur Therapie der Erkrankung ein Präparat mit möglichst geringen Nebenwirkungen eingesetzt werden. Die Behandlung der kaninen Leishmaniose mit Glucantime® ist leider häufig mit deutlichen Nebenwirkungen verbunden. Neben schmerzhaften Entzündungsreaktionen im Bereich der Applikationsstelle stehen vor allem gastrointestinale Symptome wie Vomitus, reduzierte Futteraufnahme, Diarrhoe und Melaena im Vordergrund (MORITZ et al., 1999; NOLI, 1999; STEUBER und KROKER, 2002). Ähnliche Nebenwirkungen waren auch bei Einsatz von Ol-PC zu verzeichnen. Die Mehrzahl der Patienten wies eine Schwellung im Bereich der Injektionsstelle auf. Diese war in der Regel mittelgradig ausgeprägt und ging nur in Einzelfällen mit deutlichen Entzündungsanzeichen einher. Auch gastrointestinale Symptome konnten bei der Mehrheit der Patienten beobachtet werden. Diese äußerten sich meistens in einer reduzierten Futteraufnahme oder breiigem Kotabsatz. Nur in Einzelfällen trat wässriger oder blutig-wässriger Kotabsatz auf. Etwa $\frac{3}{4}$ der Patienten zeigte unter der Therapie mit Ol-PC eine Erhöhung der Körpertemperatur. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf das Auftreten von Fieber bei Behandlung leishmaniosekranker Patienten mit Glucantime®. Allerdings führen die Hersteller des Präparates dieses Symptom als mögliche unerwünschte Wirkung auf. Während die Nebenwirkungen bei der Verabreichung von N-Methyl-Glucamin insbesondere am 4. und 5. Tag der Therapie zu beobachten sind (MORITZ et al., 1999), traten beim Einsatz von Ol-PC Nebeneffekte vermehrt zwischen dem 3. und 10. Tag der Behandlung auf.

Neben klinischen Veränderungen sind bei der Anwendung von Glucantime® vor allem auch labordiagnostische Veränderungen durch den Einsatz des Präparates zu verzeichnen. MORITZ et al. (1999) konnten in diesem Zusammenhang beispielsweise eine Leukozytopenie bei einigen Patienten beobachten. Eine Leukozytopenie im Zusammenhang mit der Behandlung mit Ol-PC trat dagegen bisher nicht auf. KRAFT et al. (1994) stellten ferner bei $\frac{2}{3}$ der Patienten, die einer Behandlung mit Glucantime® unterzogen wurden, erhöhte Plasmaaktivitäten der Pankreasenzyme fest. Diese Beobachtung konnte von MORITZ et al. (1999) bestätigt werden. In den eigenen Untersuchungen stieg bei keinem Patienten, der mit Ol-PC behandelt wurde, die Aktivität dieser Enzyme im Blutplasma an. Darüber hinaus wies kein Patient einen Anstieg von Nieren- oder Leberparametern im Blutplasma unter Therapie auf. Jedoch war ein signifikanter Anstieg des Protein-Kreatinin-Quotienten im Urin

zu verzeichnen, so dass hier gegebenenfalls eine Schädigung der Niere durch das Präparat trotz allem in Betracht zu ziehen ist. Eine Hepatotoxizität konnte beim Einsatz von Ol-PC nicht beobachtet werden. Die nephrotoxischen und hepatotoxischen Eigenschaften von N-Methyl-Glucamin werden in der Literatur dagegen vielfach beschrieben (SLAPPENDEL, 1988; GOTHE, 1991; STEUBER und KROKER, 2002) und schränken den Einsatz dieses Präparates deutlich ein.

Zahlreiche Studien und die Analyse von Fallbeispielen haben sich bereits mit der Fragestellung beschäftigt, ob durch den Einsatz von Glucantime® eine Erregerelimination erzielt werden kann (STEUBER et al., 1997; STEUBER et al., 1998; LAMOTHE, 1999; MORITZ et al., 1999). Trotz klinischer Besserung persistieren die Parasiten jedoch nach erfolgter Therapie weiterhin und sind mittels PCR im Knochenmark nachweisbar. In Einzelfällen scheint allerdings nach einer Kombinationstherapie mit Glucantime® und Allopurinol ein parasitologisch negatives Ergebnis erzielt werden zu können (LAMOTHE, 1999; MORITZ et al., 1999). Leider vermag auch eine Monotherapie mit Ol-PC nicht, die Erreger vollständig zu eliminieren. Ergebnisse von Untersuchungen über eine Kombinationstherapie von Ol-PC und Allopurinol liegen bisher noch nicht vor.

GRAMMICIA et al. (1992) konnten nach Anwendung von N-Methyl-Glucamin eine 41fach gesteigerte Resistenz der Parasiten gegenüber dem Wirkstoff nachweisen. Hieraus können häufige Rezidive resultieren, die höhere Dosierungen und längere Behandlungszeiträume zur Folge haben (LAMOTHE, 1999). Über die Entwicklung von Resistenzen nach Einsatz von Ol-PC können keine Angaben gemacht werden. Ob das Ausbleiben der klinischen Besserung bei einem Patienten der Studie (Patient Nr. 20), nachdem er bereits einmalig erfolgreich mit Ol-PC behandelt wurde, auf einer verminderten Empfänglichkeit der Parasiten gegen den Wirkstoff beruht, wurde nicht weiterführend untersucht. Diese interessante Beobachtung könnte jedoch als Anlaß für weiterführende Untersuchungen gesehen werden.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den neuen Wirkstoff Oleyl-Phosphocholin (Ol-PC) zur Therapie der kaninen viszerale Leishmaniose zu untersuchen. Neben der Prüfung der klinischen Wirksamkeit galt es Nebenwirkungen zu erfassen und hinsichtlich ihrer Tolerierbarkeit zu bewerten. Mittels PCR wurde der Erregerstatus der Patienten vor und nach der Therapie miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob die Behandlung mit Ol-PC zu einer Erregerfreiheit im Knochenmark und in diesem Sinne zu einer Heilung der Tiere führen kann.

Die Untersuchung umfasste 3 Behandlungsgruppen. In einem Vorversuch erhielten die Patienten (n = 3) jeweils 5 Injektionen in einer Dosierung von 4,2 µmol/kg KGW. Nach Modifikation der Therapie wurden die weiteren Patienten (n = 21) in zwei Behandlungsgruppen (Gruppe A und Gruppe B) eingeteilt. Den Hunden der Gruppe A wurden insgesamt 8 Injektionen in einer Dosierung von 7,0 µmol/kg KGW verabreicht. Die Tiere der Gruppe B erhielten jeweils 9 Injektionen zu je 5,3 µmol/kg KGW des Wirkstoffes. Der Wirkstoff lag in einer liposomalen Formulierung vor und wurde subkutan injiziert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten eine gute klinische Wirksamkeit des Präparates. In den Behandlungsgruppen A und B konnte eine signifikante Besserung bezüglich der Gesamtheit der Symptome nachgewiesen werden. Lethargie, Hautveränderungen, generalisierte Lymphknotenvergrößerungen und blasse Schleimhäute besserten sich in beiden Gruppen signifikant. Neben einer positiven Beeinflussung der klinischen Symptomatik lies sich auch eine gute Wirksamkeit von Ol-PC gegenüber krankheitsspezifischer labordiagnostischer Veränderungen feststellen. Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt der Erythrozyten, Hämatokritwert, Thrombozytenzahl und Gesamtleukozytenzahl zeigten ebenso wie die Konzentration von Albumin im Blutplasma einen signifikanten Anstieg unter dem Einfluß von Ol-PC.

Auffallend erschien im Vergleich zu anderen Präparaten die kurze beschwerdefreie Zeit nach der Therapie mit Ol-PC. Die mediane Remissionszeit betrug in Gruppe A 4 Wochen und in Gruppe B 7 Wochen.

Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen bei der Therapie der kaninen Leishmaniose mit Ol-PC stellten bei 88,9 % aller Patienten gastrointestinale Symptome dar. Außerdem fielen bei 81,5 % aller behandelten Hunde Schwellungen der Injektionsstellen und bei 74,1 %

eine Erhöhung der rektal gemessenen Körpertemperatur auf. Da die Behandlung aber bei keinem Tier auf Grund einer unerwünschten Medikamentenwirkung abgebrochen werden musste, sind die Nebenwirkungen von Ol-PC insgesamt als tolerierbar einzustufen. Eine negative Beeinflussung hämatologischer und blutchemischer Parameter wurde im Zusammenhang mit der Therapie nicht beobachtet. Jedoch war ein signifikanter Anstieg des Protein-Kreatinin-Quotienten im Urin nachweisbar.

Die mit Ol-PC behandelten Hunde zeigten nach erfolgter Therapie keine signifikant erniedrigten Raten von negativen PCR-Ergebnissen im Knochenmark. Eine Erregerfreiheit und in diesem Sinne eine Heilung der kaninen Leishmaniose mittels Ol-PC war durch die in dieser Studie eingesetzten Dosierungen und Therapieintervalle nicht zu erzielen. Jedoch zeigte ein deutlich verminderter prozentualer Anteil zytologisch positiver Tiere nach der Therapie eine deutliche Reduktion der Erregerdichte im Knochenmark. Die zytologische Untersuchung des Knochenmarkes deutete darüber hinaus auf eine positive Beeinflussung der Hämatopoese durch die Behandlung mit Ol-PC hin. Die gute klinische Wirksamkeit des Präparates wird auf diese Weise unterstrichen.

7. Summary

The aim of this study was to investigate the efficacy of the new drug OI-PC in the treatment of canine visceral leishmaniasis. Beside testing the clinical potency, the goal was to register and evaluate side effects and rank them in terms of their tolerance by the patient. Using PCR technique the pre- and posttherapeutical presence of parasites was evaluated. The purpose was to determine if the treatment with OI-PC resulted in parasite elimination and therefore cure of the animals.

The trial consisted of 3 groups of patients. In a preliminary test 3 dogs got 5 injections each in a dosage of 4,2 $\mu\text{mol/kg}$ bodyweight. After modification of the treatment the other patients (n=21) were split in two groups (group A and group B). Dogs in group A were treated with 8 injections of 7,0 $\mu\text{mol/kg}$ bodyweight, the animals in group B got 9 injections in a dosage of 5,3 $\mu\text{mol/kg}$ bodyweight. The drug was used in a liposomal formulation and injected subcutaneously.

The results showed a good clinical efficacy of the drug. In group A and B a significant improvement of the overall symptoms was demonstrated. Skin lesions and lethargy in both groups improved significantly as well as generalized lymphadenopathy and pale mucous membranes.

Beside the positive influence on clinical symptoms, OI-PC revealed in an improvement of disease specific abnormalities in blood parameters such as Erythrocyte count, corpuscular hemoglobin concentration, packed cell volume, platelet count, total leukocyte count and plasma albumin concentration

It is remarkable that the tested OI-PC treatment regiments showed in comparison to other drugs a somewhat short period of time with reduced clinical symptoms. The median remission time in group A was up to 4 weeks and in group B 7 weeks.

Noted side effects under treatment with OI-PC were gastrointestinal symptoms in 88,9 % of all patients. Furthermore swelling of the injection side in 81,5 % of all treated dogs were noted and 74,1 % of all patients had an increased body temperature. In none of the animals the treatment had to be discontinued. This suggests that the side effects of OI-PC are acceptable.

A negative interaction on hematological or biochemical parameters was not noticed over the course of the treatment. However there was a significant increase of the urine protein-creatinine-ratio.

Dogs treated with OI-PC did not show significantly lower rate of negative PCR results in the bone marrow after treatment. An elimination of parasites and therefore a cure of canine viscerele leishmaniasis could not been achieved using OI-PC within the tested regiments. But cytological bone marrow evaluation showed a decreased parasite load after treatment and a positive influence on the hematopoieses supporting good clinical efficiency of the drug.

8. Literaturverzeichnis

ADHYA, S.; CHATTERJEE, M.; HASSAN, Q.; MUKHERJEE, S.; SEN, S. (1995):
Detection of Leishmania in the blood of early kala-azar patients with the aid of the
polymerase chain reaction.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89, 622-624.

AISA, M.J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGRO, M.; FISA, R.; RIERA, M.C.; DE
COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. (1998):
Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic
areas and significance of the pattern.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 154-159.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F.; MCGACHY, H.A.; MCKENZIE, A.N.; WALKER,
W.; CARTER, K.C. (2002):
An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following Leishmania
mexicana infection.
Eur. J. Immunol. 32, 2923-2933.

ALVAR, J. (1999):
Leishmania and HIV co-infection in the Mediterranean countries.
Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002,
78-81.

ALVAR, J.; CRUZ, I.; MORALES, M.A.; CANAVATE, C. (2002):
Molecular biology tools in leishmaniasis diagnosis and epidemiology.
Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002,
25-30.

ALVAR, J.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; PACHON, I.; CALBACHO, E.; RAMIREZ, M.;
VALLES, R.; GUILLEN, J.L.; CANAVATE, C.; AMELA, C. (1996):
AIDS and Leishmania infantum. New approaches for a new epidemiological problem.
Clin. Dermatol. 14, 541-546.

AMELA, C.; LOPEZ-GAY, D.; ALBERDI, J.C.; CASTILLA, J. (1996):

Injecting drug use as a risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients.

Eur. J. Epidemiol. 12, 91-92.

ASEFFA, A.; GUMY, A.; LAUNOIS, P.; MACDONALD, H.R.; LOUIS, J.A.; TACCHINI-COTTIER, F. (2002):

The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.

J. Immunol. 169, 3232-3241.

ASHFORD, D.A.; BADARO, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M.G.; DAVID, J.R. (1993):

Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 48, 1-8.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R.H. (1995):

Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 53, 251-255.

ASHFORD, R.W.; BATES, P.A. (1998):

Leishmaniasis in the Old World.

In: Cox, F.E.G., Kreier, J.P., Wakelin, D.: Microbiology and Microbial Infections, Bentliff, G., 215-240.

BALDELLI, R.; BATTELLI, G.; MAROLI, M.; MOLLICONE, E.; GUDI, A.; STEGAGNO, G.; TASINI, G. (2001):

A new stable focus of canine leishmaniasis in northern Italy.

Parassitologia 43, 151-153.

BANETH, G. (2002):

A review of the treatment of canine leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 15-19.

BANETH, G.; JAFFE, C.L. (1999):

Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 40-44.

BANETH, G.; SHAW, S.E. (2002):

Chemotherapy of canine leishmaniosis.

Vet. Parasitol. 106, 315-324.

BALDELLI, R.; BATTELLI, G.; MAROLI, M.; MOLLICONE, E.; GUDI, A.; STEGAGNO, G.; TASINI, G. (2001):

A new stable focus of canine leishmaniasis in northern Italy.

Parassitologia 43, 151-153.

BANETH, G. (2002):

A review of the treatment of canine leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 15-19.

BANETH, G.; JAFFE, C.L. (1999):

Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 40-44.

BANETH, G.; SHAW, S.E. (2002):

Chemotherapy of canine leishmaniosis.

Vet. Parasitol. 106, 315-324.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.L. (1998):

Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis.

J. Exp. Med. 188, 1941-1953.

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. (2000):

A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity.

J. Immunol. 165, 969-977.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; VAN DER MEIDE, P.H.; SLAYTER, M.V.; NACY, C.A. (1989):

Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*.

J. Immunol. 143, 266-274.

BEN SAID, M.; JAIEM, A.; SMOORENBURG, M.; SEMIAO-SANTOS, S.J.; BEN RACHID, M.S.; EL HARITH, A. (1992):

Canine leishmaniasis in the region of Enfidha (Central Tunisia). Assessment of seroprevalence with direct agglutination (DAT) and indirect immunofluorescence (IFAT).

Bull. Soc. Pathol. Exot. 85, 159-163.

BENDERITTER, T.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L.; QUILICI, M. (1988):

Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 335-341.

BERNADINA, W.E.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; CIARAMELLA, P. (1997):

An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*.

Vet. Parasitol. 73, 207-213.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.;

LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. (1996):

Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 273-277.

BHATTACHARYA, S.K.; JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.;

SINDERMAN, H.; JUNGE, K.; KARBWANG, J.; BRYCESON, A.D.; BERMAN, J.D.

(2004):

Efficiency and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India.

Clin. Infect. Dis. 38, 217-221.

BINHAZIM, A.A.; CHAPMAN, W.L.J.; LATIMER, K.S.; STYLES, M.; COMER, K.

(1992):

Canine leishmaniasis caused by leishmania infantum in two Labrador retrievers.

J. Vet. Diagn. Invest. 4, 299-305.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.;

CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. (2001):

Atypical forms of canine leishmaniasis.

Vet. J. 162, 108-120.

BOGDAN, C. (1998):

Leishmaniose: Prinzipien der Immunantwort und Funktion von Stickstoffmonoxid.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 111, 409-414.

BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. (1990):

Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of Leishmania major amastigotes.

Eur. J. Immunol. 20, 1131-1135.

BOGDAN, C.; SCHÖNIAN, G.; BANULS, A.-L.; HIDE, M.; PRATLONG, F.; LORENZ, E.; RÖLLINGHOFF, M.; MERTENS, R. (2001):

Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area:

Case report and review of the literature.

Clinical Infectious Diseases 32, 302-306.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; ALTAMURA, M.; VARVARA, B.; CECI, L. (1990):
Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis.

Parassitologia 32, 275-281.

BREISER, A.; KIM, D.J.; FLEER, E.A.; DAMENZ, W.; DRUBE, A.; BERGER, M.;
NAGEL, G.A.; EIBL, H.; UNGER, C. (1987):

Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice.

Lipids 22, 925-926.

BRUCE-CHWATT, L.J. (1972):

Blood transfusion and tropical disease.

Trop. Dis. Bull. 69, 825-826.

BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E. (1997):

Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog.

J. Small. Anim. Pract. 38, 29-30.

CARRASCO, L.; DE LARA, F.C.; MARTIN, E.; HERVAS, J.; MOLLEDA, J.M.; GOMEZ-
VILLAMANDOS, J.C.; LOPEZ, R. (1997):

Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral leishmaniasis.

Vet. Rec. 141, 519-521.

CASTELL, J.V.; GOMEZ-LECHON, M.J.; DAVID, M.; ANDUS, T.; GEIGER, T.;
TRULLENQUE, R.; FABRA, R.; HEINRICH, P.C. (1989):

Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human
hepatocytes.

FEBS Lett. 242, 237-239.

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; DEPLAZES, P. (1998):

Langzeitbehandlung von natürlich mit *L. infantum* infizierten Hunden mit Allopurinol.

Proceedings der 18. Parasitologischen Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie
e.V., Dresden, 24.-28.03.1998.

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. (1999):

Clinical, serologic and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*.

Vet. Intern. Med. 13, 330-334.

CHAN, M.M. (1993):

T cell response in murine *Leishmania mexicana amazonensis* infection: production of IFN-gamma by CD8⁺ cells.

Eur. J. Immunol. 23, 1181-1184.

CHOWDHURY, M.A.; RAFIQUEUDDIN, A.K.; HUSSAIN, A. (1992):

Aldehyde test (Formol-Gel test) in the diagnosis of kalar-azar (visceral leishmaniasis).

Trop. Doct. 22, 185-186.

CHUNGE, C.N.; GACHIHI, G.; MUIGAI, R.; WASUNNA, K.; RASHID, J.R.; CHULAY, J.D.; ANABWANI, G.; OSTER, C.N.; BRYCESON, A.D. (1985):

Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. III. Successful treatment using a combination of sodium stibogluconate plus allopurinol.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79, 715-718.

CHUNGE, C.N.; OWATE, J.; PAMBA, H.O.; DONNO, L. (1990):

Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconat.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 221-225.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.;

CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. (1997):

A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.

The Veterinary Record 141, 539-543.

COHEN, A.D.; BOYER, J.D.; WEINER, D.B. (1998):

Modulating the immune response to genetic immunization.

FASEB J 12, 1611-1626.

- CROFT, S.L.; NEAL, R.A.; PENDERGAST, W.; CHAN, J.H. (1987):
The activity of alkyl phosphorcholines and related derivates against *Leishmania donovani*.
Biochem. Pharmacol. 36, 2633-2636.
- CUNHA, F.Q.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. (1992):
Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxid synthetase by interferon-gamma in murine macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 182, 1155-1159.
- DAVID, J.R.; STAMM, L.M.; BEZERRA, H.S.; SOUZA, R.N.; KILLICK-KENDRICK, R.; (2001):
Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 839-847.
- DAVIES, C.R.; MAZLOUMI GAVGANI, A.S.; HODJATI, M.H.; MOHITE, H. (2001):
Impact of insectide impregnated dog collars on the incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs and children.
Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 87-90.
- DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU, G. (1999):
Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases).
J. Vet. Intern. Med. 13, 413-415.
- DEPLAZES, P.; GRIMM, F.; PAPAPRODROMOU, M.; CAVALIERO, T.; GRAMICCIA, M.; CHRISTOFI, G.; CHRISTOFI, N.; ECONOMIDES, P.; ECKERT, J. (1998):
Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1.
Acta Trop. 71, 169-178.
- DEPLAZES, P.; METTLER, M. (2003):
Epidemiologische und klinische Aspekte der caninen Leishmaniose in Zentraleuropa.
Vet-MedReport Sonderausgabe V2, 12-13.

- DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. (1995):
Specific IgG1 and IgG2 antibody responses to dogs to *Leishmania infantum* and other
parasites.
Parasite Immunol. 17, 451-458.
- DEREURE, J.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F.; GOUVERNET, J.; MAJHOUR, J.;
BELAZZOUG, S.; KHIAMI, A.; JARRY, D.; PERIERES, J.; RIOUX, J.A. (1998):
Canine leishmaniasis from *Leishmania infantum*: value and production of the latex test.
Ecoepidemiologic applications.
Bull. Soc. Pathol. Exot. 91, 300-305.
- DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J.-P. (1999):
Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in
the Mediterranean Basin.
Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002,
18-25.
- DESJEUX, P. (2001):
The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95, 239-243.
- DESJEUX, P. (2002):
Urbanisation of the leishmaniasis.
Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002,
49-55.
- DIAZ-ESPINEIRA, M.M.; SLAPPENDEL, R.J. (1997):
A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands.
Vet. 19, 69-71.
- DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.;
MACMICKING, J.; RÖLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. (1998):
Type 1 interferon (IFN α / β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune
response to a protozoan parasite.
Immunity 8, 77-87.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. (1997):

Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil.

Clinical Infectious Diseases 25, 1240-1242.

DUBE, A.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, J.K.; MISRA, A.; NAIK, S.; KATIYAR, J.C. (1998):

Vaccination of langur monkeys (*Presbytis entellus*) against *Leishmania donovani* with autoclaved *L.major* plus BCG.

Parasitology 116, 219-221.

DUNAN, S.; FROMMEL, D.; MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, B.W.; CRUZ, A.; QUILICI, M. (1989):

Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis.

Parasite Immunol. 11, 397-402.

DURAND, R.; PAUL, M.; PRATLONG, F.; RIVOLLET, F.; DUBREUIL-LEMAIRE, M.L.; HOUIN, R.; ASTIER, A.; DENIAU, M. (1998):

Leishmania infantum: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis.

Antimicrob. Agents Chemother. 42, 2141-2143.

DYE, C. (1996):

The logic of visceral leishmaniasis control.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 125-130.

D'ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N.M.; CHEHIMI, J.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHAN, S.H.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; NICKBARG, E. (1992):

Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells.

J. Exp. Med. 176, 1387-1398.

EIBL, H. (2000):

Miltefosine for visceral leishmaniasis.

The New England Journal of Medicine 342, 894-895.

EIBL, H.; UNGER, C. (1990):

Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug.

Cancer Treat. Rev. 17, 233-242.

EL HARITH, A.; SLAPPENDEL, R.J.; REITER, I.; VAN KNAPEN, F.; DE KORTE, P.;

HUIGEN, E.; KOLK, A.H. (1989):

Application of a direkt agglutination test for detection of specific anti-Leishmania antibodies in the canine reservoir.

J. Clin. Microbiol. 27, 2252-2257.

FELDMAN, E.C. (2000):

Hyperadrenocorticism.

In: Ettinger, S.J. und Feldman, E.C.: Textbook of Veterinary Internal Medicine, W.B.

Saunders Company, 1460-1488.

FERNANDEZ-PEREZ, F.J.; MENDEZ, S.; DE LA FUENTE, C.; CUQUERELLA, M.;

GOMEZ, M.T.; ALUNDA, J.M. (1999):

Value of Western blotting in the clinical follow-up in canine leishmaniasis.

J. Vet. Diagn. Invest. 11, 170-173.

FERNANDEZ-PEREZ, F.J.; MENDEZ, S.; DE LA FUENTE, C.; GOMEZ-MUNOZ, M.T.;

CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J.M. (1999):

Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirekt immunofluorescence.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 61, 652-653.

FERRER, L. (1999):

Clinical aspects of canine leishmaniasis.

Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain – 1999, 6-10.

FERRER, L. (2002):

The pathology of canine leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 21-24.

- FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTUS, M. (1995):
Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis.
Vet. Rec. 136, 514-516.
- FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J.A.; RAMIS, A. (1991):
Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs.
Vet. Pathos. 28, 342-343.
- FERRER, L.; RABANAL, R.M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D. (1988):
Identification of Leishmania donovani amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining.
Res. Vet. Sci. 44, 194-196.
- FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. (1989):
Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th 1 clones.
J. Exp. Med. 170, 2081-2095.
- FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. (2001):
Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates.
Veterinary Parasitology 99, 105-111.
- FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. (1997):
Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis.
Vet. Immunol. Immunopathol. 56, 319-327.
- FRUCHT, D.M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J.J.; KOYASU, S. (2001):
IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanism emerge.
Trends Immunol. 22, 556-560.
- GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. (1988):
Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones.
J. Immunol. 140, 4245-4252.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F.J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. (1996):

Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis.

Parasite Immunol. 18, 617-623.

GASKIN, A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J.; BIRKENHEUER, A.; TOMLINSON, L.; GRAMICCIA, M.; LEVY, M.; STEURER, F.; KOLLMAR, E.; HEGARTY, B.C.; AHN, A.; BREITSCHWERDT, E.B. (2002):

Visceral leishmaniasis in a New York Foxhound Kennel.

J. Vet. Intern. Med. 16, 34-44.

GEORGE, J.W.; NIELSEN, S.W.; SHIVELEY, J.N.; HOPEK, S.; MROZ, S. (1976):

Canine leishmaniasis with amyloidosis.

Vet. Pathol. 13, 365-373.

GESSNER, A.; BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. (1994):

Leishmaniose.

In: Röllinghoff, M. und Rommel, M.: Immunologische und Molekulare Parasitologie, Enke, 29-49.

GINEL, P.J.; LUCENDA, R.; LOPEZ, R.; MOLLEDA, J.M. (1998):

Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis.

Journal of Small Animal Practice 39, 271-274.

GOERBLICH, T. (2000):

Das Kreuz des Suedens.

Partner Hund 7, 48-50.

GONZALES, J.L.; FERMIN, M.L.; GARCIA, P.; ROLLAN, E.; CASTANO, M. (1990):

Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis.

Zentralbl. Veterinarmed. 37, 377-382.

GOTHE, R. (1991):

Leishmaniosen des Hundes in Deutschland: Erregerfauna und -biologie, Epidemiologie, Klinik, Pathogenese, Diagnose, Therapie und Prophylaxe.

Kleintierpraxis 36, 69-84.

GOTHE, R.; NOLTE, I.; KRAFT, W. (1997):

Leishmaniosen des Hundes in Deutschland: epidemiologische Fallanalysen und Alternativen zur bisherigen kausalen Therapie.

Tierärztliche Praxis 25, 68-73.

GRADONI, L. (1999):

Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe.

Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain – 1999, 32-39.

GRADONI, L. (2002):

The diagnosis of canine leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 7-14.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. (1992):

Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment.

Ann. Trop. Med. Parasitol. 86, 613-620.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. (1990):

Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha.

J. Immunol. 145, 4290-4297.

GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B.J.; NACY, C.A. (1990):

Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism.

J. Immunol. 144, 278-283.

GREINER, M. (1993):

Serologische Diagnostik der Hundeleishmaniose: Der dot-ELISA als einfache Alternative zum herkömmlichen ELISA.

Tierärztliche Praxis 21, 465-468.

- GRÖNE, A.; FONFARA, S.; MARKUS, S.; BAUMGÄRTNER, W. (1999):
RT-PCR amplification of various canine cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes.
J. Vet. Med. 46, 301-310.
- GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D.L.; SEDER, R.A. (1998):
Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection.
Nat. Med. 4, 1409-1415.
- GURUNATHAN, S.; SACKS, D.L.; BROWN, D.R.; REINER, S.L.; CHAREST, H.;
GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R.A. (1997):
Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*.
J. Exp. Med. 186, 1137-1147.
- GURUNATHAN, S.; WU, C.Y.; FREIDAG, B.L.; SEDER, R.A. (2000):
DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity.
Curr. Opin. Immunol. 12, 442-447.
- HERVAS, J.; CHANCON-M., L.F.; SANCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.;
CARRASCO, L.; CASTILLO, J.A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. (1999):
Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain.
J. Feline Med. Surg. 1, 101-105.
- HERWALDT, B.L. (1999):
Miltefosine - the long awaited therapy for visceral leishmaniasis?
The New England Journal of Medicine 341, 1840-1842.
- HERWALDT, B.L. (2000):
Miltefosine for visceral leishmaniasis.
The New England Journal of Medicine 342, 895.
- JAFFE, C.L. (2003):
Prospectives for a vaccine against canine leishmaniasis.
Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002,
66-71.

JAKSCH, W.; GLAWISCHNIG, E. (1990):

Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und der Hautkrankheiten bei Haus- und Heimtieren.

Parey-Verlag.

JENDROSSEK, V.; HANDRICK, R. (2003):

Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers.

Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents 3; 343-353.

JERGENS, A.E.; WILLARD, M.D. (2000):

Diseases of the Large Intestine.

In: Ettinger, S.J. und Feldman, E.C.: Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat, W.B. Saunders Company, 1238-1256.

JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. (1999):

Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis.

The New England Journal of Medicine 341, 1795-1800.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. (2000):

Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies.

Science 290, 1351-1354.

KHALIL, E.A.; EL HASSAN, A.M.; ZIJLSTRA, E.E.; MUKHTAR, M.M.; GHALIB, H.W.; MUSA, B.; IBRAHIM, M.E.; KAMIL, A.A.; ELSHEIKH, M.; BABIKER, A.;

MODABBER, F. (2000):

Autoclaved Leishmania major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan.

Lancet 356, 1565-1569.

KILLICK-KENDRICK, R. (2002):

The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host.

Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65, 37-42.

KILLICK-KENDRICK, R. (2002):

The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 57-68.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M. (1999):

Biology of sand fly vektors of Mediterranean canine leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 26-31.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.;

PUECH, M.-P.; CADIERGUES, M.C. (1997):

Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis.

Medical and Veterinary Entomology 11, 105-111.

KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; DOMINGO, M.; SCHÖNIAN, G.;

ZAHNER, H.; BURKHARDT, E. (2002):

Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*.

Vet. Parasitol. 109, 9-17.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.;

POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.;

PAPADOPOULOS, O. (2001):

A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis.

Veterinary Parasitology 98, 247-261.

KRAFT, W.; BAUER, G. (1994):

Akute Pankreatopathien als Nebenwirkungen der Leishmaniotherapie?

Kleintierpraxis 39, 309-311.

KROKER, R. (2002):

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen.

In: Löscher, W., Ungemach, F.G. und Kroker, R.: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, Parey-Verlag, 205-244.

KUBAR, J.; QUARANTA, J.F.; MARTY, P.; LELIEVRE, A.; LE FICHOUX, Y.; AUFEUVRE, J.P. (1997):

Transmission of *L.infantum* by blood donors.

Nat. Med. 3, 368.

KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C. (1992):

Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice.

Antimicrob. Agents Chemother. 36, 1630-1634.

LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; REYNES, J.; MAUBOUSSIN, J.-C.;

OZIOL, E.; DEDET, J.-P.; BASTIEN, P. (2000):

Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients.

J. Clin. Microbiol. 38, 236-240.

LAMOTHE, J. (1999):

Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric).

Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain – 1999, 12-17.

LANDFEAR, S.M.; IGNATUSHCHENKO, M. (2001):

The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids.

Mol. Biochem. Parasitol. 115, 1-17.

LANZARO, G.C.; LOPES, A.H.; RIBEIRO, J.; SHOEMAKER, C.B.; WARBURG, A.;

SOARES, M.; TITUS, R.G. (1999):

Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex.

Insect. Mol. Biol. 8, 267-275.

LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. (1995):

Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection.

Eur. J. Immunol. 25, 2220-2227.

LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D.; KUBAR, J. (1998):

Short- and long-term efficiency of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice.

Antimicrob. Agents Chemother. 42, 654-658.

LEONTIDES, L.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A.F.; GALATOS, A.D.; MYLONAKIS, M.E. (2002):

A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece.

Veterinary Parasitology 109, 19-27.

LEONTIDES, L.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A.F.; GALATOS, A.D.; MYLONAKIS, M.E. (2002):

A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece.

Vet. Parasitol. 109, 19-27.

LESTER, S.J.; KENYON, J.E. (1996):

Use of allopurinol to treat visceral leishmaniasis in a dog.

JAVMA 209, 615-617.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S. (1990):

Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania* major through the induction of nitric oxide.

J. Immunol. 145, 4306-4310.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, W.L.; ZILTENER, H. (1989):

Macrophage activation by interferon- γ from host-protective T cells inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis.

Eur. J. Immunol. 19, 1227-1232.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. (1990):

Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine.

J. Immunol. 144, 4794-4797.

LING, G.V.; RUBY, A.L.; HARROLD, D.R.; JOHNSON, D.L. (1991):

Xanthine-containing urinary Calculi in dogs given allopurinol.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, 1935-1940.

LOCKSLEY, R.M.; SCOTT, P. (1991):

Helper-T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function.

Immunology Today 12, A58-61.

LOPEZ, R.; LUCENDA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P.J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, J.M.

(1996):

Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis.

Zentralbl. Veterinarmed. 43, 469-474.

LUCENA, R.; GINEL, P.J.; LOPEZ, R.; NOVALES, M.; MARTIN, E.; MOLLEDA, J.M.

(1996):

Antinuclear antibodies in dogs with leishmaniasis.

Zentralbl. Veterinarmed. 43, 255-259.

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F.R. (2000):

Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in Leishmania.

Mol. Biochem. Parasitol. 111, 1-14.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANELLI, C.; POLI, A. (1995):

Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble Leishmania infantum antigen and indirekt immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis.

Vet. Parasitol. 59, 13-21.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. (1996):

Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay.

Vet. Parasitol. 65, 1-9.

MANCIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. (1989):

Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results.

Parassitologia 31, 213-230.

MAROLI, M.; MIZZONI, V.; SIRAGUSA, C.; D'ORAZI, A.; GRADONI, L. (2001):
Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of
deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy.
Medical and Veterinary Entomology 15, 358-363.

MARTINEZ, S.; MARR, J.J. (1992):
Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis.
N. Engl. J. Med. 326, 741-744.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P.D.; CERON, J.J. (2002):
Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis.
Vet. Rec. 150, 241-244.

MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. (1992):
Western Blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kd
and 16-kd antigens for diagnosis and epidemiologic purposes.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 47, 764-771.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. (1995):
PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from
humans and dogs.
J. Clin. Microbiol. 33, 1145-1149.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P.; KOHLER, P.; ECKERT, J. (1996):
PCR for detection and characterization of parasites (*Leishmania*, *Echinococcus*,
Microsporidia, *Giardia*).
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 138, 133-138.

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE (2000):
Cure for fatal tropical disease - oral treatment of leishmaniasis.
Pressemitteilung vom 18. 03. 2000.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; TAFURI, W.L.; TOLEDO,
V.P.; DA SILVA, A.R.; REIS, A.B.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, P.W. (1996):
Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91, 695-697.

MAZZI, R. (1976):

Cutaneous leishmaniasis: an autochthonous case in Switzerland?

Dermatologica 153, 104-105.

MBONGO, N.; LOISEAU, P.M.; BILLION, M.A.; ROBERTO-GERO, M. (1998):

Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes.

Antimicrob. Agents Chemother. 42, 352-357.

MBOW, M.L.; BLEYENBERG, J.A.; HALL, L.R.; TITUS, R.G. (1998):

Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*.

J. Immunol. 161, 5571-5577.

MCKENZIE (1984):

A Study of the Transmission of Canine Leishmaniasis by the Tick *Rhipicephalus sanguineus*, and an Ultrastructural Comparison of the Promastigote.

Stillwater, Oklahoma State University.

MENDEZ, S.; GURUNATHAN, S.; KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MOGA, M.A.;

SKEIKY, Y.A.; CAMPOS-NETO, A.; REED, R.A.; SEDER, R.A.; SACKS, D. (2001):

The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge.

J. Immunol. 166, 5122-5128.

MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. (1999):

Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 46-53.

MILON, G.; TITUS, R.G.; CEROTTINI, J.C.; MARCHAL, G.; LOUIS, J.A. (1986):

Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4⁺ T cells in susceptible BALB/c as compared with resistant CBA mice.

J. Immunol. 136, 1467-1471.

MOMENI, A.Z.; JALAYER, T.; EMAMJOMEH, M.; KHAMESIPOUR, A.; ZICKER, F.; GHASSEMI, R.L.; DOWLATI, Y.; SHARIFI, I.; AMINJAVAHARI, M.; SHAFIEI, A.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; HASHEMI-FESHARKI, R.; NASSERI, K.; GODAL, T.; SMITH, P.G.; MODABBER, F. (1999):

A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L.major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran.

Vaccine 17, 466-472.

MORITZ, A.; STEUBER, S. (1999):

Autochton in Deutschland aufgetretener Fall von kaniner Leishmaniose.

Tierärztliche Umschau 54, 607-610.

MORITZ, A.; STEUBER, S.; GREINER, M. (1999):

Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis.

Exp. Clin. Med. 23, 279-283.

MORITZ, A.; WALCHEK, B.K.; WEISS, D.J. (2003):

Flow cytometric detection of activated platelets in the dog.

Veterinary Clinical Pathology 32, 6-12.

MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W. (1991):

The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 response.

Immunology Today 12, A49-53.

MURRAY, H.W. (2000):

Suppression of post treatment recurrence of experimental visceral leishmaniasis in t-cell-deficient mice by oral miltefosine.

Antimicrob. Agents Chemother. 44, 3235-3236.

MURRAY, H.W.; DELPH-ETIENNE, S. (2000):

Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanism.

J. Infect. Dis. 181, 795-799.

NATHAN, C. (1992):

Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.

FASEB J 6, 3051-3064.

NAUCKE, T.J. (2003):

Sandmücken und Leishmaniose.

[www.members.aol.com/TJ Naucke/germany.html](http://www.members.aol.com/TJ_Naucke/germany.html)

NAUCKE, T.J.; PESSON, B. (2000):

Presence of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany.

Parasitol. Res. 86, 335-336.

NEOGY, A.B.; VOULDOUKIS, I.; SILVA, O.A.; TSELENTIS, Y.; LASCOMBE, J.C.; SEGALIN, T.; RZEPKA, D.; MONJOUR, L. (1992):

Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 47, 772-777.

NIETO, C.G.; BARRERA, R.; HABELA, M.A.; NAVARETTE, I.; MOLINA, C.; JIMENEZ, A.; SERRERA, J.L. (1992):

Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*.

Vet. Parasitol. 44, 175-182.

NIETO, C.G.; NAVARETTE, I.; HABELA, M.A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. (1992):

Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection.

Vet. 45, 33-47.

NOLI, C. (1999):

Leishmaniose des Hundes.

Waltham Focus Jahrgang 9, 16-24.

NOXON, J.O. (1989):

Systemic antifungal chemotherapy.

In: Kirk, R.W.: Current Veterinary Therapy, W.B. Saunders, 1101-1106.

OLIVA, G.; GRADONI, L.; CIARAMELLA, P.; DE LUNA, R.; CORTESE, L.; ORSINI, S.; DAVIDSON, R.N.; PERSECHINO, A. (1995):

Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*.

J. Antimicrob. Chemother. 36, 1013-1019.

OLIVA, G.; GRADONI, L.; CORTESE, L.; ORSINI, S.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; DE LUNA, R.; PERSECHINO, A. (1998):

Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis.

Ann. Trop. Med. Parasitol. 92, 165-171.

OPITZ, M. (1996):

Hautmanifestation bei der Leishmaniose.

Tierärztliche Praxis 24, 284-291.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. (2001):

Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs.

JAVMA 219, 1076-1083.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIEVRE, A.; HAAS, P. (1998):

Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France.

Veterinary Parasitology 75, 273-277.

PARK, A.Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. (2002):

The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*.

J. Immunol. 168, 5771-5777.

PARK, A.Y.; SCOTT, P. (2001):

IL-12: keeping cell-mediated immunity alive.

Scand. J. Immunol. 53, 529-532.

PENNISI, M.G. (2002):

A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 39-48.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A.M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.;

GAMBARELLI, F.; FONTES, H.; DUMON, H.; QUILICI, M. (1993):

Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 49, 364-369.

PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F.; DUMON, H.; FONTES, M.; DUNAN, S.; MARY, C.; TOGA, B.; QUILICI, M. (1994):

Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients.

J. Clin. Microbiol. 32, 746-749.

PINELLI, E. (1996):

Protective immune response against *Leishmania infantum* in dogs.

Proefschrift, Universiteit Utrecht.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. (2000):

Infection of canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity.

Veterinary Parasitology 92, 181-189.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.M.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. (1995):

Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner.

Eur. Immunol. 25, 1594-1600.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. (2002):

Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy.

Veterinary Parasitology 106, 181-191.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A. (1991): Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study.

Nephron 57, 444-452.

POLI, A.; SOZZI, S.; GUIDI, G.; BANDINELLI, P.; MANCIANTI, F. (1997):

Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis.

Vet. Parasitol. 71, 263-271.

PUMAROLA, M.; BREVIK, L.; BADIOLA, J.; VARGAS, A.; DOMINGO, M.; FERRER, L. (1991):

Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs.

J. Comp. Pathol. 105, 279-286.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. (2001):

Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs.

Parasitology 122, 253-261.

RAMSAY, A.J.; RAMSHAW, I.A.; ADA, G.L. (1997):

DNA immunization.

Immunol. Cell. Biol. 75, 360-363.

RAVEL, S.; CUNY, G.; REYNES, J.; VEAS, F. (1995):

A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells.

Acta Trop. 59, 187-196.

REITHINGER, R.; TEODORO, U.; DAVIES, C.R. (2001):

Topical Insecticide Treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis.

Emerging Infectious Diseases 7, 872-876.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C.L. (1999):

Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before and after drug treatment.

Vet. Immunol. Immunopathol. 71, 69-76.

RIBEIRO, J. (1989):

Vector saliva and its role in parasite transmission.

Exp. Parasitol. 69, 104-106.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E. (1996):

Viable *Leishmania infantum* in urin and semen in experimentally infected dogs.

Parasitol. Today 12, 412.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E.; GALLEGU, M.; AISA, M.J.; CASTILLEJO, S.; FISA, R.; RIBAS, N.; CARRIO, J.; ALBEROLA, J.; ARBOIX, M. (1999):

Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimonate.

Vet. Parasitol. 84, 33-47.

RODGERS, M.R.; OPPER, S.J.; WIRTH, D.F. (1990):

Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*.

Exp. Parasitol. 71, 267-275.

ROMAN, M.; MARTIN-OROZCO, E.; GOODMAN, J.S.; NGUYEN, M.D., SATO, Y.;

RONAGHY, A.; KORNBLUTH, R.S.; RICHMAN, D.D.; CARSON, D.A.; RAZ, E. (1997):

Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants.

Nat. Med. 3, 849-854.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. (1999):

Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique.

Vet. Rec. 144, 262-264.

SACKS, D.; BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; SEDER, R.; VALENZUELA, J.;

RIBEIRO, J. (2001):

Perspectives for new vaccines against leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 31-37.

SACKS, D.; BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; SEDER, R.; VALENZUELA, J.; RIBEIRO, J. (2002):

Perspectives for new vaccines against leishmaniasis.

Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain – 2002, 31-37.

SACKS, D.; PIMENTA, P.F.; MCCONVILLE, M.J.; SCHNEIDER, P.; TURCO, S.J. (1995): Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan.

J. Exp. Med. 181, 685-697.

SADICK, M.D.; HEINZEL, F.P.; HOLADAY, B.J.; PU, R.T.; DAWKINS, R.S.; LOCKSLEY, R.M. (1990):

Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism.

J. Exp. Med. 171, 115-127.

SATO, Y.; ROMAN, M.; TIGHE, H.; LEE, D.; CORR, M.; NGUYEN, M.D.; SILVERMAN, G.J.; LOTZ, M.; CARSON, D.A.; RAZ, E. (1996):

Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science 273, 352-354.

SAWAYA, B.P.; BRIGGS, J.P.; SCHNERMANN, J. (1995):

Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties.

J. Am. Soc. Nephrol. 6; 154-164.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. (2002):

Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay.

Vet. Parasitol. 104, 275-285.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; MESSER, G. (1992):

Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite.

Proceedings of the National Academy of Science 89, 9944-9948.

SCOTT, P.A.; DAVIDSON, R.N.; MOODY, A.H.; GRANT, H.R.; FELMINGHAM, D.; SCOTT, G.M.; OLLIARO, P.; BRYCESON, A.D. (1992):

Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86, 617-619.

SHARIFI, I.; FEKRI, A.R.; AFLATONIAN, M.R.; KHAMESIPOUR, A.; NADIM, A.; MOUSAVI, M.R.; MOMENI, A.Z.; DOWLATI, Y.; GODAL, T.; ZICKER, F.; SMITH, P.G.; MODABBER, F. (1998):

Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam.

Iran. Lancet 351, 1540-1543.

SHERWOOD, J.A. (2000):

Miltefosine for visceral leishmaniasis.

The New England Journal of Medicine 342, 895.

SJOLANDER, A.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E. (1998):

Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis.

J. Immunol. 160, 3949-3957.

SLAPPENDEL, R.J. (1988):

Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands.

Vet. Q. 10, 1-16.

SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E. (1997):

The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial.

Vet. Q. 19, 10-13.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. (2001):

Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology.

J. Clin. Microbiol. 39, 560-563.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. (2000):

The host response to Leishmania infection.

Adv. Immunol. 74, 275-317.

STEUBER, S.; KROKER, R. (2002):

Chemotherapie der Hemoprotozoen.

In: Löscher, W., Ungemach, F.G. und Kroker, R.: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, Parey-Verlag, 360-376.

STEUBER, S.; MORITZ, A.; SCHIRRMANN, I.; GREINER, M. (1998):

PCR Follow-up Examination After Treatment of Canine Leishmaniosis (CaL).

Tokai J. Exp. Clin. Med. 23, 285-292.

STEUBER, S.; SCHIRRMANN, I.; GREINER, M.; MORITZ, A. (1997):

Therapiekontrolle der kaninen Leishmaniose mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 19, 104.

SUNDAR, S.; GUPTA, L.B.; MAKHARIA, M.K.; SINGH, M.K.; VOSS, A.;

ROSENKAIMER, F.; ENGEL, J.; MURRAY, H.W. (1999):

Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine.

Ann. Trop. Med. Parasitol. 93, 589-597.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.;

JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. (2002):

Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis.

N. Engl. J. Med. 347, 1739-1746.

SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M.K.; GOYAL, A.K.; MANDAL, A.K.;

VOSS, A.; HILGARD, P.; MURRAY, H.W. (1998):

Trial of oral miltefosin for visceral leishmaniasis.

Lancet 352, 1821-1823.

TABOADA, J.; MERCHANT, S.R. (2000):

Protozoal and miscellaneous infections.

In: Ettinger, S.J. und Feldman, E.C.: Textbook of Veterinary Internal Medicine, W.B.

Saunders Company, 1878-1879.

TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEI, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOUIS, J.A. (2000):

An immunomodulatory function of neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*.

J. Immunol. 165, 2628-2636.

TASSI, P.; ORMAS, P.; MADONNA, M.; CARLI, S.; BELLOLI, C.; DE NATALE, G.; CECI, L.; MARCOTRIGIANO, G.O. (1994):

Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog.

Res. Vet. Sci. 56, 144-150.

TESH, R.B. (1995):

Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?

Am. J. Trop. Med. Hyg. 52, 287-292.

TURCO, S.J. (1990):

The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule.

Exp. Parasitol. 70, 241-245.

VALENZUELA, J.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M. (2001):

Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein.

J. Exp. Med. 194, 331-342.

VALLADARES, J.E.; ALBEROLA, J.; ESTEBAN, M.; ARBOIX, M. (1996):

Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs.

Vet. Rec. 138, 181-183.

VALLADARES, J.E.; FREIXAS, J.; ALBEROLA, J.; FRANQUELO, C.; CHRISTOFOL, C.; ARBOIX, M. (1997):

Pharmakinetiks of liposome-encapsulated meglumine antimonate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 57, 403-406.

VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; ALBEROLA, J.; GALLEGO, M.; PORTUS, M.; CHRISTOFOL, C.; FRANQUELO, C.; ARBOIX, M. (1998):

Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*.

Vet. Parasitol. 75, 33-40.

VAMVAKIDIS, C.D.; KOUTINAS, A.F.; KANAKOUDIS, G.; GEORGIADIS, G.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. (2000):

Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*).

Vet. Rec. 146, 698-703.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; BRANDT, J.; VANSTEENKISTE, W. (1998):

A sensitive and specific 30-min-Dot-ELISA for the Detection of antileishmania antibodies in the dog.

Vet. Parasitol. 79, 221-228.

VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R.; KAGERUKA, P. (1995):

First evaluation of the use of allopurinol as a single drug for the treatment of canine leishmaniasis.

Vlaams Diergeneeskund Tijdschr 64, 208-211.

VERCAMMEN, F.; DEDEKEN, R. (1995):

Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol.

Vet. Rec. 137, 252.

VERCAMMEN, F.; DEDEKEN, R. (1996):

Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis.

Vet. Rec. 139, 264.

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J.C.; NUSSLER, A.K.; TSELENTIS, Y.; DA SILVA, O.A.; GENTILINI, M.; MOSSALAYI, D.M.; MONJOUR, L.; DUGAS, B. (1996):

Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway.

Antimicrob. Agents Chemother. 40, 253-256.

WEBSTER, P.; RUSSEL, D.G. (1993):

The flagellar pocket of trypanosomatides.

Parasitol. Today 9, 201-206.

WHO (2001):

Wirkstoff gegen Tropenkrankheit Leishmaniose.

www.who.int.

WHO (2003):

Miltefosine - 1200 patients in Phase IV trial in India.

www.who.int.

WHO (2003):

Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris).

www.who.int.

WHO (2003):

Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis.

www.who.int.

WHO (2003):

Public/private partnership: developing an oral treatment for visceral leishmaniasis.

www.who.int.

WIJEYARATNE, P.M.; ARSENAULT, L.K.; MURPHY, C.J. (1994):

Endemic disease and development: the leishmaniasis.

Acta Trop. 56, 349-364.

WOLSCHRIJN, C.F.; MEYER, H.P.; HAZEWINKEL, H.A.; WOLVEKAMP, W.T. (1996):

Destructive Polyarthritis in a dog with leishmaniasis.

J. Small Anim. Pract. 37, 601-603.

XU, D.; LIEW, F.Y. (1995):

Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*.

Immunology 84, 173-176.

9. Anhang

9.1 Lösungen und Puffer

1x TBE-Elektrophoresepuffer

450 ml 10x TBE-Puffer

50 ml Aqua bidest.

Der 1x konzentrierte TBE-Puffer findet sowohl als Elektrophoresepuffer als auch bei der Anfertigung des Geles Verwendung.

2%iges Agarosegel

150 ml TBE 1fach Puffer

3,0 g Agarose

Durch Aufkochen in der Mikrowelle erfolgt die vollständige Auflösung der Agarose. Nach Abkühlung auf 64° C wird 1 µl Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel unter Vermeidung von Blasenbildung ausgegossen. Nachdem das Gel vollständig erstarrt ist, kann es verwendet werden.

Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	1	2	3
Rasse	Mischling	Dobermann	Galgo Espanol
Alter (Jahre)	4	2	6
Geschlecht	m	w	m
Gewicht (kg)	22,5	27,0	23,4
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Italien (1)	Italien (1)	Spanien (1)
Vorbehandlung	Glucantime, Allopurinol	Glucantime, Allopurinol	-
Gruppe	Vorversuch	Vorversuch	Vorversuch
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Blasse Schleimhäute</u>	<u>Hautveränderungen (exfoliative Dermatitis, diffuse Alopezie, periorbitale Alopezie, nicht ulzerierende Hautknoten), generalisierte Lymphknotenvergrößerung, Diarrhoe*</u>	Blasse Schleimhäute, <u>Epistaxis</u>
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	<u>Thrombozytopenie</u>	Anämie, <u>Thrombozytopenie</u> , Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie	<u>Anämie</u> , Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	AK-Titer positiv (PCR negativ)
Erregernachweis nach Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Dauer der Remission (Wochen)	40	6	48
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	ja (unmittelbar nach Therapieende)	ja (unmittelbar nach Therapieende)	nein
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Inappetenz/Anorexie Schwellung der Injektionsstelle	Breiiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstelle, erhöhte Körpertemperatur	Breiiger Kotabsatz, Inappetenz, Schwellung der Injektionsstelle, erhöhte Körpertemperatur
Anmerkungen	Ehrlichiose negativ	*In einer Kotuntersuchung wurde Clostridium perfringens +++ nachgewiesen	-

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	4	5	6
Rasse	Boxer	Boxer	Rottweiler
Alter (Jahre)	3	6	7
Geschlecht	wk	wk	w
Gewicht (kg)	29,5	25,0	36,0
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	Spanien (1)	Griechenland, Spanien (2)
Vorbehandlung	-	Ol-PC, Allopurinol	-
Gruppe	A	A	A
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>nicht ulzerierende</u> <u>Hautknoten</u>), <u>generalisierte</u> <u>Lymphknoten-</u> <u>vergrößerung</u>	Blasse Schleimhäute, Inappetenz, Gewichtsverlust	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>diffuse Alopezie</u>), blasse Schleimhäute, <u>generalisierte</u> <u>Lymphknoten-</u> <u>vergrößerung</u> , Arthropathie, <u>Lethargie</u> , respiratorische Symptomatik
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	Hyperglobulinämie	Anämie, Leukozytopenie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie, Azotämie	Anämie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie,
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	Zytologie (Knochenmark) positiv	PCR positiv
Erregernachweis nach Therapie	PCR positiv	n.d.	PCR positiv
Dauer der Remission (Wochen)	28	0	1
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	nein	-	nein
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Inappetenz, breiiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur/Fieber	Inappetenz/Anorexie, breiiger Kotabsatz, Vomitus (die Nebenwirkungen sind von den krankheitsbedingten Symptomen nicht eindeutig abgrenzbar)	Breiiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstellen
Anmerkungen	Der Hund wurde nach dem Auftreten von Symptomen erneut mit Ol-PC behandelt (vgl. Patienten- Nr. 16)	Euthanasie während der Behandlung auf Grund des sich verschlechternden Allgemeinbefindens	Der Hund zeigte zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchung eine hochgradig eingeschränkte Leistungsfähigkeit und eine deutliche respiratorische Symptomatik, die Besitzer wünschten keine weiterführende Diagnostik

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	7	8	9
Rasse	Mischling	Mischling	Husky
Alter (Jahre)	2	9	4
Geschlecht	wk	wk	w
Gewicht (kg)	25,0	24,0	19,5
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	unbekannt	Spanien (1)
Vorbehandlung	Allopurinol	Allopurinol	-
Gruppe	A	A	A
Klinische Symptome vor Therapie	Blasse Schleimhäute, generalisierte Lymphknoten- vergrößerung, <u>Epistaxis, Anorexie,</u> <u>Lethargie</u>	<u>Hautveränderungen</u> (<u>Ohrrand-</u> <u>veränderungen,</u> <u>nicht ulzerierende</u> <u>Hautknoten</u>), <u>blasse</u> <u>Schleimhäute,</u> <u>Arthropathie, Lethargie,</u> <u>Fieber</u>	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis,</u> <u>periorbitale Alopezie, nicht</u> <u>ulzerierende Hautknoten,</u> <u>Ulzera</u>), Gewichtsverlust, <u>Lethargie, Arthropathie</u>
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	Anämie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie, <u>Azotämie</u>	Anämie, <u>Leukozytopenie,</u> <u>Thrombozytopenie,</u> Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie	Anämie, Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie, Hypoalbuminämie
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Erregernachweis nach Therapie	n.d.	PCR positiv	PCR positiv
Dauer der Remission (Wochen)	3	5	6
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	nein	nein	nein
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Inappetenz (Nebenwirkung nicht von klinischer Symptomatik abgrenzbar), erhöhte Körpertemperatur	Inappetenz, Vomitus, erhöhte Körpertemperatur	Inappetenz, breiiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur
Anmerkungen	Infusionstherapie während des stationären Aufenthaltes Der Hund wurde aufgrund des sich verschlechternden Allgemeinbefindens bei erneut steigenden Harnstoff- und Kreatinin- konzentrationen im Serum vor der Kontrolluntersuchung euthanasiert	Ehrlichiose und Dirofilariose negativ	Da zum Zeitpunkt der Entlassung der Verdacht auf eine Demodikose bestand, wurde nach der Therapie mit OI-PC eine lokale Therapie mit Amitraz durchgeführt

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	10	11	12
Rasse	Mischling	Mischling	Mischling
Alter (Jahre)	6	2	11
Geschlecht	m	mk	wk
Gewicht (kg)	16,5	25,5	22,4
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Griechenland (1)	Spanien (1)	Spanien (1)
Vorbehandlung	-	Allopurinol	-
Gruppe	A	A	A
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen</u> (diffuse Alopezie, Onychogrypose), <u>blasse Schleimhäute</u> , <u>Gewichtsverlust</u> , <u>Lethargie</u> , Arthropathie	<u>Hautveränderungen</u> (exfoliative Dermatitis, <u>Ulzera</u> , Onychogrypose), generalisierte Lymphknoten- vergrößerung	Blasse Schleimhäute, Gewichtsverlust, <u>Epistaxis</u> , <u>Lethargie</u>
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	Anämie, <u>Leukozytopenie</u> , <u>Thrombozytopenie</u> , Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie, <u>Hypoalbuminämie</u>	Hyperglobulinämie	Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Hyperglobulinämie, Hypoalbuminämie
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	Zytologie (Knochenmark) positiv
Erregernachweis nach Therapie	PCR positiv	PCR positiv	n.d.
Dauer der Remission (Wochen)	48	3	1
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	ja (6 Wochen nach Therapieende)	nein	nein
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Inappetenz/Anorexie, breiiger Kotabsatz, Vomitus, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur	Inappetenz, Schwellung der Injektionsstellen	Inappetenz/Anorexie, Vomitus, Schwellung der Injektionsstellen
Anmerkungen	Babesiose und Ehrlichiose positiv Da der Hund zur Behandlung der Ehrlichiose (neben Carbesia®) auch Doxycyclin erhielt, sind die gastrointestinalen Symptome nicht eindeutig den Nebenwirkungen zuzuordnen Bisher ist keine erneute Verschlechterung der Symptomatik bekannt	-	Ehrlichiose positiv Die Ehrlichiose wurde mit Carbesia® behandelt Der Hund wurde auf Grund des sehr schlechten Allgemeinbefindens und Ausbleiben der Besserung der labordiagnostischen Veränderungen 1 Woche nach Beendigung der Behandlung euthanasiert

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	13	14	15
Rasse	Mischling	Boxer	Mischling
Alter (Jahre)	4	4	4
Geschlecht	w	w	w
Gewicht (kg)	11,5	21,0	25,5
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	Spanien (1)	Spanien (1)
Vorbehandlung	Allopurinol	-	-
Gruppe	A	A	A
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>diffuse Alopezie</u> , periorbitale Alopezie, Ohrtrandveränderungen, <u>Ulzera</u> , <u>Onychogrypose</u>), <u>blasse Schleimhäute</u> , <u>generalisierte</u> <u>Lymphknoten-</u> <u>vergrößerung</u> , <u>Gewichtsverlust</u> , <u>Lethargie</u>	Hautveränderungen (<u>exfoliative Dermatitis</u> , Ohrtrandveränderungen), <u>blasse Schleimhäute</u> , <u>Epistaxis</u> , <u>Lethargie</u>	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , diffuse Alopezie), <u>generalisierte</u> <u>Lymphknoten-</u> <u>vergrößerung</u> , <u>Lethargie</u>
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	Anämie, Hyperglobulinämie, <u>Hypoalbuminämie</u>	Anämie, Leukozytose, Hyperglobulinämie, Hypoalbuminämie	<u>Anämie</u> , Leukozytopenie, <u>Thrombozytopenie</u> , Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie,
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Erregernachweis nach Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Dauer der Remission (Wochen)	4	20	12
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	nein	ja (6 Wochen nach Therapieende)	ja (6 Wochen nach Therapieende)
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Schwellung der Injektionsstellen, Diarrhoe (wässrig, breiig)	Schwellung der Injektionsstellen	Breiiger Kotabsatz
Anmerkungen	-	Ehrlichiose negativ Bisher ist keine erneute Verschlechterung der Symptomatik bekannt	Ehrlichiose und Babesiose negativ Bisher ist keine erneute Verschlechterung der Symptomatik bekannt

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	16	17	18
Rasse	Boxer	Mischling	Mischling
Alter (Jahre)	4	7	2
Geschlecht	wk	m	mk
Gewicht (kg)	25,0	38,0	29,0
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	Griechenland (2)	Spanien (1)
Vorbehandlung	Ol-PC, Allopurinol	Allopurinol	Allopurinol
Gruppe	B	B	B
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen (nicht ulzerierende Hautknoten)</u> , <u>Fieber</u> , generalisierte Lymphknotenvergrößerung, <u>Lethargie</u> ¹⁾	Hautveränderungen (exfoliative Dermatitis, Ulzera), generalisierte Lymphknoten- vergrößerung*	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>Alopezia areata</u>), generalisierte Lymphknoten- vergrößerung, <u>Lethargie</u> ¹⁾
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	Hyperproteinämie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie ¹⁾	Hyperglobulinämie*	Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie ¹⁾
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Erregernachweis nach Therapie	n.d.	n.d.	PCR positiv
Dauer der Remission (Wochen)	76	n.b.	52
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	ja (unmittelbar nach Therapieende)	nein	ja (1 Jahr nach Therapieende)
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Inappetenz/Anorexie, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur/Fieber (einige Nebenwirkungen sind von den krankheitsbedingten Symptomen nicht eindeutig abgrenzbar)	Vomitus, Diarrhoe (wässrig, breiig), erhöhte Körpertemperatur	Breiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur
Anmerkungen	Ehrlichiose und Dirofilariose negativ Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt Der Hund wurde nach dem Auftreten von Symptomen erneut mit Ol-PC behandelt (vgl. Patienten-Nr. 5)	*Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt	Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt Bisher ist keine erneute Verschlechterung der Symptomatik bekannt

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

¹⁾ Obwohl dieser Hund nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurde, konnte eine Bewertung der klinischen Symptomatik (z.B. Hautveränderungen, Lethargie, Gewichtsverlust) durch mündliche Mitteilung des Besitzers erfolgen. Symptome, die der Besitzer auf Grund mangelnder Fachkenntnis nicht beurteilen konnte (z.B. Lymphknotenvergrößerung) oder die ausbleibenden Kontrollen labordiagnostischer Parameter blieben unberücksichtigt.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	19	20	21
Rasse	Presa Canario	Presa Canario	Mischling
Alter (Jahre)	3	3	4
Geschlecht	m	m	wk
Gewicht (kg)	40,0	41,0	36,0
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	Spanien (1)	Spanien (1)
Vorbehandlung	Allopurinol	Ol-PC, Allopurinol	Glucantime, Allopurinol
Gruppe	B	B	B
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>periorbitale Alopezie</u>), <u>generalisierte</u> <u>Lymphknoten-</u> <u>vergrößerung</u> , Arthropathie, <u>Lethargie</u>	Hautveränderungen (exfoliative Dermatitis, periorbitale Alopezie), generalisierte Lymphknoten- vergrößerung, Arthropathie, Lethargie ¹⁾	Blasse Schleimhäute, <u>Epistaxis</u> , <u>Lethargie</u> ¹⁾
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	<u>Anämie</u> , Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie, Hypoalbuminämie	Anämie, Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie ¹⁾	Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Hyperproteinämie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie ¹⁾
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Erregernachweis nach Therapie	PCR positiv	n.d.	n.d.
Dauer der Remission (Wochen)	9	0	1
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	nein	nein	ja (unmittelbar nach Therapieende)
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Breiiiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstelle, erhöhte Körpertemperatur	Breiiiger Kotabsatz, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur/Fieber	Inappetenz/Anorexie, Vomitus, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur/Fieber
Anmerkungen	Ehrlichiose negativ Der Hund wurde nach dem Auftreten von Symptomen erneut mit Ol-PC behandelt (vgl. Patienten-Nr. 20)	Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt Auf die Behandlung trat keine Besserung der Symptomatik ein	Ehrlichiose und Dirofilariose negativ Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

¹⁾ Obwohl dieser Hund nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurde, konnte eine Bewertung der klinischen Symptomatik (z.B. Hautveränderungen, Lethargie, Gewichtsverlust) durch mündliche Mitteilung des Besitzers erfolgen. Symptome, die der Besitzer auf Grund mangelnder Fachkenntnis nicht beurteilen konnte (z.B. Lymphknotenvergrößerung) oder die ausbleibenden Kontrollen labordiagnostischer Parameter blieben unberücksichtigt.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	22	23	24
Rasse	Mischling	Mischling	Jack-Russell-Terrier
Alter (Jahre)	2	4	7
Geschlecht	wk	mk	mk
Gewicht (kg)	15,0	6,0	8,2
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	Spanien (1)	Portugal (1)
Vorbehandlung	-	Allopurinol	Allopurinol
Gruppe	B	B	B
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>Ulzera</u> , <u>Onychogrypose</u>), <u>generalisierte</u> <u>Lymphknoten-</u> <u>vergrößerung</u> , blasse Schleimhäute, <u>Arthropathie</u> , <u>Lethargie</u>	Anorexie, Lethargie	<u>Blasse Schleimhäute</u> , Gewichtsverlust, <u>Lethargie</u>
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	<u>Anämie</u> , <u>Leukozytopenie</u> , Hyperproteinämie, <u>Hypoalbuminämie</u> , Hyperglobulinämie	Anämie, Hyperproteinämie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie, Azotämie	Anämie, Leukopenie, <u>Hyperglobulinämie</u>
Erregernachweis vor Therapie	Zytologie (Knochenmark) positiv, PCR negativ	PCR positiv	Zytologie (Knochenmark) positiv, PCR negativ
Erregernachweis nach Therapie	Zytologie und PCR negativ	n.d.	n.d.
Dauer der Remission (Wochen)	24	0	5
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	ja (1 Woche nach Therapieende)	-	nein
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur	Inappetenz/Anorexie, Vomitus, Diarrhoe (breiig, wässrig, z.T. blutig), Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur (einige Nebenwirkungen sind von den krankheitsbedingten Symptomen nicht eindeutig abgrenzbar)	Vomitus, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur
Anmerkungen	-	Auf Grund des sehr schlechten Allgemeinbefindens wurde der Hund vor der Durchführung der Kontrolluntersuchung euthanasiert	-

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

Fortsetzung Tabelle 30: Einzeltierbefunde

Patienten-Nummer	25	26	27
Rasse	Mischling	Mischling	Mischling
Alter (Jahre)	1	1	1
Geschlecht	m	wk	m
Gewicht (kg)	6,5	25,5	13,0
Auslandsanamnestik Import (1), Urlaub (2)	Spanien (1)	Spanien (1)	Italien (1)
Vorbehandlung	-	-	Glucantime, Allopurinol
Gruppe	B	B	B
Klinische Symptome vor Therapie	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>diffuse Alopezie</u> , <u>periorbitale Alopezie</u>), generalisierte Lymphknoten- vergrößerung ¹⁾	<u>Hautveränderungen</u> (<u>exfoliative Dermatitis</u> , <u>Ulzera</u> , <u>nicht ulzerierende</u> <u>Hautknoten</u>), generalisierte Lymphknoten- vergrößerungen ¹⁾	<u>Hautveränderungen</u> (<u>diffuse Alopezie</u> , <u>periorbitale Alopezie</u> , <u>Ulzera</u>), generalisierte Lymphknoten- vergrößerung ¹⁾
Labordiagnostische Veränderungen vor Therapie	Anämie, Leukozytose, Hyperproteinämie, Hyperglobulinämie ¹⁾	ohne besonderen Befund	Anämie, Leukozytose, Hyperglobulinämie ¹⁾
Erregernachweis vor Therapie	PCR positiv	PCR positiv	PCR positiv
Erregernachweis nach Therapie	n.d.	n.d.	PCR positiv
Dauer der Remission (Wochen)	32	20	3
Gabe von Allopurinol nach Therapieende (Zeitpunkt)	nein	nein	nein
Beobachtete Nebenwirkungen während der Therapie	Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur/ Fieber	Breißer Kotabsatz, Vomitus, Schwellung der Injektionsstellen, erhöhte Körpertemperatur	Inappetenz, Schwellung der Injektionsstellen
Anmerkungen	Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt	Der Hund wurde nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt	Ehrlichiose und Dirofilariose negativ Der Hund wurde erst 1 Jahr nach Abschluß der Behandlung erneut in der Klinik vorgestellt

Klinische Symptome und labordiagnostische Veränderungen, die sich auf die Therapie gebessert haben, wurden unterstrichen.

¹⁾ Obwohl dieser Hund nicht zur Kontrolluntersuchung vorgestellt wurde, konnte eine Bewertung der klinischen Symptomatik (z.B. Hautveränderungen, Lethargie, Gewichtsverlust) durch mündliche Mitteilung des Besitzers erfolgen. Symptome, die der Besitzer auf Grund mangelnder Fachkenntnis nicht beurteilen konnte (z.B. Lymphknotenvergrößerung) oder die ausbleibenden Kontrollen labordiagnostischer Parameter blieben unberücksichtigt.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn HDoz. Dr. A. Moritz, der mir dieses interessante Thema überlassen hat und mir mit seiner fachlichen Unterstützung und den wertvollen Ratschlägen bei der Anfertigung dieser Arbeit stets zur Seite gestanden hat.

Herrn Prof. Dr. E.-G. Grünbaum danke ich für seine fachliche Unterstützung sowie zwei sehr lehrreiche und in freundschaftlicher Umgebung verbrachte Jahre.

Ich möchte allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere, die sehr viel zu dem guten Arbeitsklima in der Klinik beigetragen haben, für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Ein großes Dankeschön geht hierbei an Frau Dr. N. Bauer für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft und ihr großes Interesse am Verlauf dieser Studie. Frau C. Fischer, Frau C. Simon und Herrn Dr. M. Schneider danke ich von ganzem Herzen für ihren freundschaftlichen Beistand.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen Medizinisch-technischen Assistenten/-innen für ihre ständige Bereitschaft, die zahlreichen Blut- und Urinproben zu untersuchen, bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau E. Juengst-Carter für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der PCR.

Weiterhin gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. H. Eibl vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie sowie Herrn J. Steffan und PD Dr. R. Kaminsky von der Firma Novartis für die Bereitstellung des Präparates. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zusätzlich möchte ich Herrn Dr. S. Steuber für die fachliche Unterstützung bei dem Aufbau der PCR danken. Seine wichtigen Informationen haben maßgeblich an der raschen Etablierung dieser Methode in unserem Labor beigetragen.

Frau Dr. U. Kaim danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft bei der Einführung in die molekularbiologischen Labortechniken.

Herrn Dr. K. Failing und Herrn H. Heiter danke ich für die geduldige Beratung und Betreuung bei der statistischen Auswertung.

Abschließend geht mein größter Dank an meine Eltern und Lars, die mir immer verständnisvoll Rückhalt gegeben haben und mit mir diesen Weg gegangen sind.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-460-8

